ß-LAKTAMASEN BEI ENTEROBACTER CLOACAE, DIE ZUR RESISTENZ GEGENÜBER PENICILLINEN UND CEPHALOSPORINEN FÜHREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

REGINA TOLXDORFF-NEUTZLING
aus
DUISBURG

BONN 1985

Diss. Bonn
1984

ß-LAKTAMASEN BEI ENTEROBACTER CLOACAE, DIE ZUR RESISTENZ GEGENÜBER PENICILLINEN UND CEPHALOSPORINEN FÜHREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem. -Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

REGINA TOLXDORFF-NEUTZLING

aus

DUISBURG

BONN 1985

(D5)

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, Abteilung Medizinische Mikrobiologie für Pharmazeuten durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Trüper

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.1984

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Für meine Eltern und Otmar

"Kein Einzelnes erfüllt
für sich allein genommen,
was im Ganzen möglich ist."

K. Jacobi

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
B.	Bacillus
Clox	Cloxacillin
CTX^r	Cefotaxim-resistent
CTX^s	Cefotaxim-sensibel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
E.	Enterobacter, Escherichia
ΔE	Extinktionsdifferenz
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
K_s	Substratkonstante
K_i	Inhibitorkonstante
Kan	Kanamycin
M	Mutante
MHK	minimale Hemmkonzentration
MBK	minimale bakterizide Konzentration
N,F-	N,Formimidoyl-
Nx^r	chromosomale Nalidixinsäure-Resistenz
OD	optische Dichte
P.	Pseudomonas, Proteus
PBP	Penicillin-binde-Protein
pCMB	para-Chloromercuribenzoat
Rif	Rifampicin
R_F	Maß für Wanderungsgeschwindigkeit
RSA	Rinderserumalbumin
S.	Serratia, Staphylococcus, Shigella
S	Substratkonzentration
spez. Akt.	spezifische Aktivität
SDS	Sodiumdodecyl-Sulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tet	Tetracyclin
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v	Geschwindigkeit der Enzymreaktion
W	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Wirkungsweise von ß-Laktamantibiotika	3
1.2	Mechanismus der Resistenz gegen ß-Laktam-antibiotika und Bedeutung der ß-Laktamase	8
1.3	Entwicklung von ß-Laktamantibiotika	13
1.4	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Geräte	17
2.2	Chemikalien und Nährmedien	17
2.3	ß-Laktamantibiotika	18
2.4	Zellanzucht	19
2.5	Stammkulturen	20
2.6	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	20
2.7	Übertragung von pBP100 durch Konjugation	21
2.8	Resistenzprüfung im Replica-Verfahren	21
2.9	Wachstumsversuche	21
2.10	Agardiffusionstest	23
2.11	Herstellung von Enzymrohextrakten	24
2.12	Proteinbestimmung	25
2.13	Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität	26
2.14	Bestimmung der ß-Laktamase-Affinität	29
2.15	Bestimmung der Kryptizität von ß-Laktamasen	30
2.16	Aufnahme von C^{14}-markiertem Cefotaxim	30
2.17	Berechnung der periplasmatischen Konzentration von ß-Laktamantibiotika	31
2.18	Bestimmung des Penetrationsparameter C	31
2.19	Analytische Isoelektrofokussierung	32
2.20	Reinigung der ß-Laktamase	32
2.21	Bestimmung der enzymatischen Parameter	34
2.22	Dünnschichtchromatographie	34
2.23	Ermittlung der UV-Spektren von Hydrolyseprodukten	35
2.24	SDS-Gelelektrophorese	35
2.25	"peptide mapping" der ß-Laktamasen	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Herkunft und Auswahl der Bakterienstämme	38

Seite

3.2 MHK-Werte von Cephalosporinen und Penicillinen 39
3.3 Wachstumsversuche 46
3.3.1 Wachstum in Gegenwart verschiedener Cefotaxim-Konzentrationen 46
3.3.2 Abnahme von Cefotaxim während des Wachstums 51
3.3.3 Nachweis des enzymatischen Abbaus von Cefotaxim 51
3.3.4 Postantibiotischer Effekt (PAE) 54
3.3.5 Einfluß und Abbau von Cefotaxim nach Zugabe in der exponentiellen Wachstumsphase 55
3.3.6 Wachstum in Gegenwart von Azthreonam und Latamoxef 56
3.3.7 Wachstum und Abbau der Cephalosporine unter Einfluß von EDTA 59
3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der Resistenz 60
3.4.1 Einfluß der Enzymaktivität der ß-Laktamase auf Resistenz 60
3.4.1.1 Enzymaktivität der Cephalosporinase aus E. cloacae 61
3.4.1.2 Vergleich der Enzymaktivität und MHK bei Mutanten und Wildtypen von E. cloacae 65
3.4.1.3 Bestimmung der Menge an ß-Laktamase in E. cloacae 67
3.4.1.4 Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. cloacae 68
3.4.1.5 Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei P. cepacia 7946 70
3.4.1.6 Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. coli W3110 mit TEM-1 70
3.4.2 Einfluß der Affinität von ß-Laktamantibiotika zur ß-Laktamase auf Resistenz 71
3.4.2.1 Affinität von Cephalosporinen und Penicillinen 71
3.4.2.2 Korrelation zwischen Affinität zur ß-Laktamase und MHK bei E. cloacae 75
3.4.2.3 Affinität der ß-Laktamantibiotika zu PBP's 76

Seite

3.4.3 Einfluß der Penetration von ß-Laktamantibiotika durch die äußere Membran auf Resistenz 76
3.4.3.1 Berechnung des Penetrationsfaktors mit E. coli DC0 und DC2 76
3.4.3.2 Vergleich des Abbaus von Cefotaxim bei E. coli DC0 Tk, DC2 Tk sowie E. cloacae 208 77
3.4.3.3 Kryptizität der ß-Laktamase 79
3.4.3.4 Aufnahme von C^{14}-markiertem Cefotaxim 83
3.4.3.5 Bestimmung der Konzentration von ß-Laktamantibiotika im periplasmatischen Raum 85
3.4.4 Zusammenwirken von Enzymaktivität, Affinität zur ß-Laktamase und Penetration bei Resistenz 90
3.5 Reinigung und Charakterisierung der Cephalosporinasen aus E. cloacae 95
3.5.1 Reinigung und Anreicherung 95
3.5.2 Eigenschaften der gereinigten ß-Laktamase 98
3.5.2.1 Bestimmung des Molekulargewichts 98
3.5.2.2 "peptide mapping" der ß-Laktamasen 100
3.5.2.3 pH- und Temperaturoptimum 101
3.5.2.4 Hemmbarkeit der ß-Laktamasen 101
3.6 Kinetische Charakterisierung der ß-Laktamasen 102
3.6.1 Aufnahme von Substratsättigungskurven 102
3.6.2 Enzymkinetische Meßdaten 109
3.6.3 Ermittlung der Inhibitorkonstanten 112
3.7 Untersuchung der Hydrolyseprodukte von Cephalosporinen 123
3.7.1 Spaltprodukte von Cefotaxim 123
3.7.2 Spaltprodukte anderer Cephalosporine 124
3.7.3 UV-Spektrum der Spaltprodukte 127
3.7.4 Auftreten der Spaltprodukte im Verlauf der Hydrolyse 129

4 Diskussion 131
4.1 Charakterisierung der ß-Laktamase aus E. cloacae 132

Seite

4.2 Mechanismus der Resistenz gegen ß-Laktam-antibiotika 149

5 Zusammenfassung 169

6 Literaturverzeichnis 170

7 Anhang 199

1. Einleitung

Robert Koch entdeckte 1876 bei der Untersuchung von Milzbrand, daß Bakterien und andere Mikroorganismen die Ursache für Infektionskrankheiten **sind** (Stanier et al. 1979). Hierauf setzte in aller Welt eine intensive Entwicklung der Bakteriologie ein. Innerhalb der nächsten 25 Jahre wurden die Erreger der meisten menschlichen Infektionskrankheiten gefunden und beschrieben. Eine Kontrolle dieser Erkrankungen aber beruhte vornehmlich auf präventiven Maßnahmen in Form verbesserter Hygiene und vorbeugender Immunisierung. Die Heilung nach Ausbruch einer Infektion konnte kaum beeinflußt werden. Paul Ehrlich (1909) entwickelte Anfang dieses Jahrhunderts einen anderen Weg der Bekämpfung. Er veranlaßte die empirische Suche nach synthetischen Agentien, die eine selektiv toxische Wirkung auf pathogene Mikroorganismen ausübten und prägte den Begriff der Chemotherapie.

Das erste chemotherapeutisch wirksame Antibiotikum wurde bereits 1929 von Alexander Fleming als Ausscheidung des Schimmelpilzes Penicillium notatum gefunden. Obwohl "Penicillin" eine deutliche Hemmung des bakteriellen Wachstums bewirkte, verfolgte Fleming die Anreicherung dieser Substanz nicht weiter, da sie chemisch instabil und schwer zu reinigen war. Erst zehn Jahre später gelang einer Gruppe von Wissenschaftlern unter Leitung von H. Florey und E. Chain Reinigung und Aufklärung der Struktur (Stanier et al. 1979). Penicillin wurde dem klinischen Gebrauch zugänglich gemacht und mit großem Erfolg gegen gram-positive Organismen eingesetzt.
Eine intensive Suche nach weiteren Verbindungen dieser Substanzgruppe folgte. Zum einen, um der bereits früh auftretenden Resistenz zu begegnen - so waren fünf Jahre nach Einführung des Penicillins etwa 70% aller Staphylokokken resistent (Kirby et al. 1953) - zum anderen, um das Erregerspektrum zu erweitern. In vermehrtem Maße gewannen gram-negative Bakterien wie Enterobakterien und Pseudomonas spp. bei Hospitalinfektionen an Bedeutung (Knothe und Sietzen 1978).

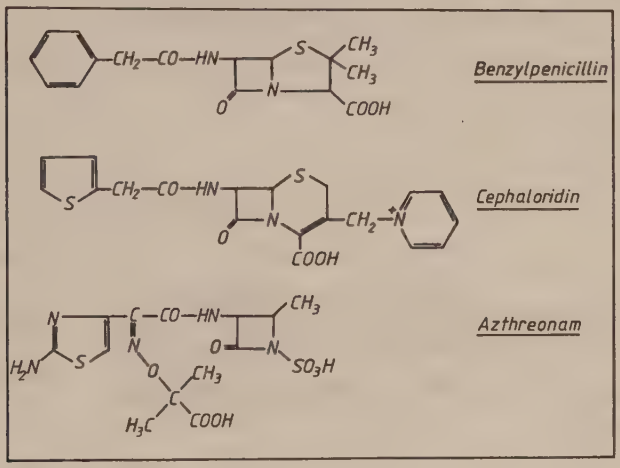
1945 fand G. Brotzu einen Schimmelpilz, Cephalosporum acremonium, mit antibakterieller Aktivität (Abraham 1983). Anfang der 50iger Jahre gelang Newton und Abraham (1956) die Isolierung eines neuen Antibiotikums, Cephalosporin C. Die Strukturaufklärung ergab, daß diese Verbindung einen zyklischen ß-Laktamring, aber,im Gegensatz zu Penicillin G, keinen fünf-gliedrigen, sondern einen sechs-gliedrigen Heterozyklus besitzt. Aufgrund des weiten Erregerspektrums von Cephalosporin C fand in den folgenden Jahren eine stürmische Entwicklung von Cephalosporinen statt, die im Gegensatz zu Penicillinen leichter in ihrer Seitenkette verändert werden können (Abraham 1981).
Eine weitere natürlich vorkommende Gruppe von ß-Laktamantibiotika sind die Cephamycine (Stapley und Birnbaum 1981). Sie werden nicht wie Penicilline oder Cephalosporine von Pilzen, sondern von einem Vertreter der Actinomyceten, Streptomyces clavuligerus, synthetisiert, der unter anderem auch die potenten ß-Laktamase-Inhibitoren Thienamycin und Clavulansäure produziert (Sawai und Tsukamoto 1982). Die Cephamycine unterscheiden sich von den Cephalosporinen durch eine 7α-Methoxygruppe.
Ende der 70iger Jahre wurde bei einer breit angelegten Untersuchung der verschiedensten Bakterienspezies eine Reihe von monozyklischen ß-Laktamverbindungen entdeckt und isoliert (Sykes et al. 1981). Nach Modifikation der Molekülstruktur und Verbesserung der antibiotischen Eigenschaften wirkten die Monobactame vor allem gegen viele gram-negative ß-Laktamase-Produzenten, Enterobakterien wie Pseudomonaden (Livermore 1981).

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, auf veränderte Umweltbedingungen durch Erwerb von Resistenzplasmiden (Wiedemann 1981), oder Mutation (Findell und Sherris 1976) zu reagieren, erfordert immer wieder die Suche nach neuen, wirksameren Antibiotika. Penicilline und Cephalosporine werden auch in Zukunft, aufgrund ihrer selektiven Wirkung und ihrer vergleichsweise geringen Toxizität für den Menschen, eine bevorzugte Rolle spielen.

1.1. Wirkungsweise von ß-Laktamantibiotika

Die ß-Laktamantibiotika werden heute anhand ihres molekularen Aufbaus in drei große Gruppen, Penicilline, Cephalosporine (einschließlich der Cephamycine) und Monobactame eingeteilt (Abb. 1).

Abb. 1: ß-Laktamantibiotika



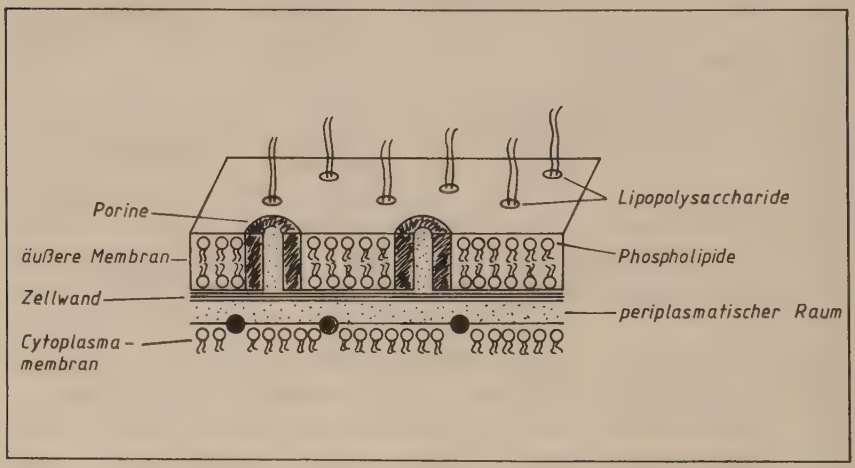
Die Strukturformeln aller andern in dieser Arbeit erwähnten und verwendeten ß-Laktamantibiotika sind im Anhang aufgeführt.

Allen ß-Laktamantibiotka gemeinsam ist die Störung der bakteriellen Zellwandsynthese. 1965 zeigten Wise und Park, sowie Tipper und Strominger unabhängig voneinander, daß Penicillin die Transpeptidierung, also die Quervernetzung des Peptido-

glycans hemmt (siehe Stryer 1979).

Im Gegensatz zu den gram-positiven Bakterien besitzen die gram-negativen Bakterien nur eine dünne, locker vernetzte Peptidoglycanschicht, der zusätzlich eine äußere Membran aufgelagert ist. Sie besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und enthält Lipoproteine, Lipopolysaccharide und Proteinkomplexe mit wassergefüllten Kanälen (Porine) (Abb. 2).

Abb. 2: Schematische Darstellung der Zellwand und äußeren Membran gram-negativer Bakterien

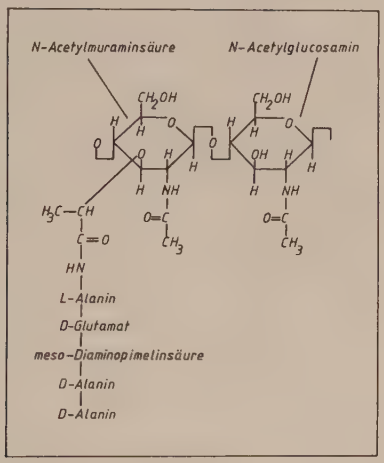


Diese äußere Bakterienmembran stellt eine sehr wirkungsvolle Permeabilitätsschranke dar. ß-Laktamantibiotika gelangen vor allem durch die Poren in den periplasmatischen Raum (Nikaido 1981). Die Penetrationsfähigkeit der verschiedenen ß-Laktamantibiotika hängt unter anderem von ihrer Ladung und Struktur ab (Nikaido und Rosenberg 1983).

Das Peptidoglycan Murein ist ein Heteropolymer und besteht zum einen aus N-Acetylgucosamin (G) und zum anderen aus N-Acetylmuraminsäure (M). Sie sind in alternierender Folge ß-1,4-glykosidisch miteinander verknüpft (Abb. 3). An die

Muraminsäure ist über eine Lactylgruppe eine Kette von Aminosäuren peptidisch angebunden.

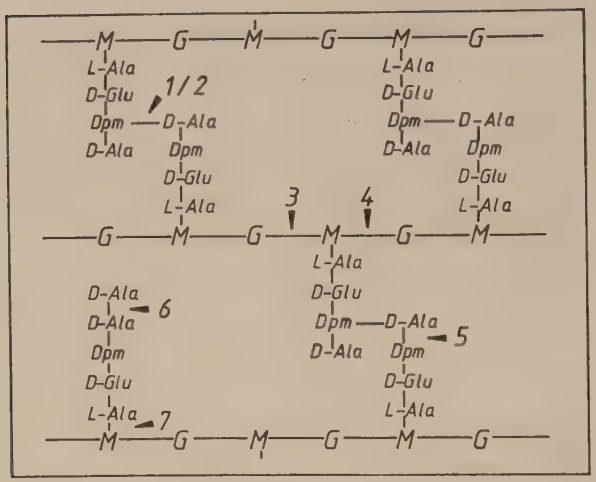
Abb. 3: Grundstruktur des Peptidoglycans (Murein)



Bei gram-negativen Bakterien (z.B. E. coli) kommt es zu einer Peptidbindung zwischen der ε-Aminogruppe der Diaminopimelinsäure des einen Peptidoglycanstranges und der γ-Carboxylgruppe des D-Alanyl-Restes eines anderen Stranges, wobei das zweite, endständige D-Alanin abgespalten wird (Abb. 4). Durch diese Peptidbindung werden die heteropolymeren Ketten zu einem sackförmigen Riesenmolekül, dem Mureinsacculus, verbunden und geben der Bakterienzelle Halt (Baddiley 1981).

Wise und Park vermuteten, daß der Grund für die Hemmung der Zellwandsynthese auf einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen Penicillinen und dem L-alanyl-γ-D-glutamyl-Teils des Peptidoglycans beruhte. Tipper und Strominger dagegen nahmen an, daß die Ähnlichkeit beim D-alanyl-D-Alanin-Rest lag, und die Transpeptidase Penicillin fälschlicherweise als Substrat erkannte. Der hierbei entstandene Penicilloyl-Enzym-Komplex konnte nicht mehr deacyliert werden (siehe Stryer 1979).

Abb. 4: Schematische Darstellung der Quervernetzung des Peptidoglycans bei E. coli



1) Transpeptidase (Verknüpfung)
2) DD-Endopeptidase (Spaltung)
3) N-Acetylglucosaminidase
4) Transglycosylase
5) LD-Carboxypeptidase
6) DD-Carboxypeptidase
7) N-Acetylmuramyl-L-Alanylamidase

Später wurden eine Reihe weiterer Penicillin-empfindlicher Enzyme in der Cytoplasmamembran entdeckt und als Penicillinbinde-Proteine (PBP) bezeichnet (Spratt 1975, 1977). Bei E. coli konnten sieben PBP's gefunden werden (Abb. 5).

Abb. 5: Penicillinbindeproteine von E. coli nach Auftrennung im Polyacrylamidgel (nach Spratt 1977)

Protein	Molekulargewicht	Moleküle / Zelle	Funktion
Ia, Ib Komplex } I	91 000	230	Ersatz für Ib Quervernetzung
II	66 000	20	Mureinelongation
III	60 000	50	Septumbildung
IV	49 000	110	D-Ala-Carboxypeptidase 1B
V	42 000	1800	D-Ala-Carboxypeptidase 1A
VI	40 000	570	

Die PBP's von E. coli wurden weitaus gründlicher als die anderer gram-negativer und gram-positiver Organismen untersucht (Waxman und Strominger 1983). Hierbei traten zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies auf (Noguchi et al. 1979).

Über die genaue Bedeutung der einzelnen PBP's bei der Zellwandsynthese und Enzymaktivität ist jedoch noch nicht sehr viel bekannt (Ghuysen 1979, Matsuhashi et al. 1981).
So sind PBP Ia und Ib wahrscheinlich am Längenwachstum der Zelle beteiligt. Sie haben sowohl Transpeptidase-, als auch Transglycosylase-Aktivität und wirken möglicherweise an Auf-, wie Abbauvorgängen mit (Waxman und Strominger 1983). ß-Laktam-Antibiotika, die vor allem an diese PBP's binden, verursachen Zell-Lysis (Spratt et al. 1977, Goodwin 1977).
Mecillinam bindet fast ausschließlich an PBP II (Spratt 1977). Aufgrund der Entstehung großer, runder Zellen bei Wachstum in Gegenwart von Mecillinam wird für PBP II eine Funktion bei Ausbildung der Zellform vermutet. PBP II hatte keine Transpeptidase-Aktivität, über die katalysierte Reaktion wird noch spekuliert (Waxman und Strominger 1983).
PBP III ist offensichtlich an Zellteilung und Septumsbildung beteiligt. Cephalosporine, die an dieses PBP binden verursachen Filamentbildung der Bakterien.
Die Funktion der kleinen PBP's IV, V und VI ist noch weitgehend unbekannt. PBP V hat Carboxypeptidase-Aktivität und bestimmt möglicherweise den Grad der Quervernetzung.

Kürzlich konnte ein Komplex bestehend aus PBP I, III und V isoliert werden (Höltje und Said 1983). Vermutlich wird durch Bildung eines Multienzymkomplexes die Koordinierung der enzymatischen Aktivität bei Zellwandaufbau und Zellteilung gewährleistet.

Aufgrund der vielen an der Peptidoglycansynthese beteiligten Enzyme können ß-Laktamantibiotika nicht nur eine essentielle Reaktion hemmen, sondern greifen je nach Struktur an den unterschiedlichsten Stellen an (Oka et al. 1980).

1.2. Mechanismen der Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika und Bedeutung von ß-Laktamasen

Die Bakterienzelle kann sich auf verschiedene Arten vor der Wirkung von ß-Laktamantibiotika schützen. Allgemein wurden zwei Mechanismen unterschieden (Richmond und Curtis 1974):

Enzymabhängige Resistenz
Sie beruht auf dem Vorhandensein von ß-Laktamasen, die die Antibiotika hydrolytisch inaktivieren.

Enzymunabhängige Resistenz ("intrinsic factors")
Hierbei spielt die Empfindlichkeit der PBP's in der Cytoplasmamembran eine Rolle. Zusätzlich ist bei gram-negativen Bakterien die Durchlässigkeit der äußeren Membran von großer Bedeutung.

Eine der ß-Laktamase-unabhängigen Ursachen für Resistenz ist Mutation zur Synthese von PBP's mit verminderter Affinität zu den ß-Laktamantibiotika. Spratt (1977) isolierte E. coli Mutanten mit Thienamycin-Resistenz, die auf veränderten PBP's beruht, und van der Weghe und Martin (1983) fanden resistente E. cloacae-Stämme mit niedriger Affinität zu Cefotaxim. Bei klinischen Isolaten von N. gonorrhoeae führt die reduzierte Bindefähigkeit von PBP I und II zur Unempfindlichkeit gegen Penicilline (Dougherty et al. 1980).
Mutation zu geringerer Permeabilität der äußeren Membran ist eine weitere Ursache. So bewirkt das Fehlen bestimmter Porine bei E. coli Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika (Jaffé et al. 1982, Komatsu et al. 1981), bei N. gonorrhoeae verursachen Veränderungen der äußeren Membran ebenfalls einen verminderten Zutritt von ß-Laktamantibiotika (Guymon et al. 1978).

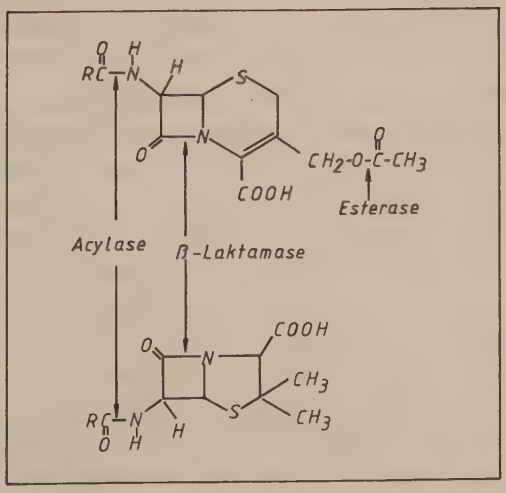
In den meisten Fällen jedoch handelt es sich bei diesen resistenten Organismen um Laborisolate, so daß die Bedeutung von Penetrations- und Affinitätsmutanten unter klinischen Bedingungen umstritten ist (Ogawara 1981, Jaffé et al. 1983).

Bei der Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika scheint der Erwerb von Resistenzplasmiden, die Penicillinasen codieren (Sykes und Matthew 1976), oder Mutation zur konstitutiven Produktion einer zuvor induzierbaren chromosomalen Cephalosporinase (Seeberg et al. 1983) im Vordergrund zu stehen.

Abraham und Chain berichteten 1940 zum ersten Mal über enzymatische Inaktivierung von Benzylpenicillin. Das hierfür verantwortliche, von einem E. coli-Stamm produzierte Enzym wurde als Penicillinase bezeichnet.
Wenige Jahre später konnte nachgewiesen werden, daß eine Penicillinase aus Staphylococcus aureus die Resistenz des Organismus gegen Penicilline verursacht (Kirby 1944).

1960 schlug Pollock den allgemeinen Namen ß-Laktamase vor, um Enzyme, die den zyklischen ß-Laktamring hydrolytisch spalten können (Abb. 6) gegen Penicillinacylasen und andere Penicillin-inaktivierende Enzyme abzugrenzen.

Abb. 6: Mögliche Spaltung von Penicillinen und Cephalosporinen (nach Sykes 1982)



In den Jahren nach Einführung der Cephalosporine entdeckte man ß-Laktamasen, die vor allem diese neue Gruppe von ß-Laktamantibiotika hydrolysieren (Hamilton-Miller 1967). Die ß-Laktamasen werden also anhand ihres Substratprofils unterschieden in Penicillinasen (EC 3.5.2.6), die hauptsächlich Penicilline, sowie Cephalosporinasen (EC 3.4.2.8), welche überwiegend Cephalosporine abbauen. Die Cephalosporinasen ihrerseits können in zwei weitere Gruppen eingeteilt werden (Mitsuhashi et al. 1981). Die einen inaktivieren moderne Cephalosporine kaum (z.B. Enzyme aus E. cloacae, P. aeruginosa u.a.), während die anderen (Cefuroximasen aus P. vulgaris oder P. cepacia) Cefuroxim, Cefotaxim u.a. mit hoher Aktivität hydrolysieren.

1965 fanden Datta und Kontomichalou, daß die ß-Laktamase eines Ampicillin-resistenten E. coli-Stammes (TEM) von einem Plasmid codiert wird, wodurch die Möglichkeit und Gefahr einer raschen Resistenzausbreitung gegeben ist. Tatsächlich konnte diese Penicillinase (Datta und Richmond 1966) nicht nur in vielen Enterobakterien, sondern auch bei Neisseria (Eriquez und D'Amato 1979) nachgewiesen werden. Die Entdeckung, daß das TEM-Gen auf einem Transposon liegt, (Hedges und Jacob 1974) erklärt seine weite Verbreitung unter den verschiedensten Bakteriengattungen.

Bereits 1963 beschrieben Smith, sowie Hamilton-Miller chromosomal codierte ß-Laktamasen bei gram-negativen Bakterien. Richmond und Sykes teilten 1973 die Fülle der bis dahin untersuchten ß-Laktamasen anhand ihres Substratprofils und ihrer physiko-chemischen Eigenschaften in fünf Klassen ein (Tabelle 1). Sykes und Matthew (1976) stellten keine grundsätzlich neue Einteilung vor, aber sie unterschieden zwei Hauptgruppen, nämlich chromosomal-codierte und durch einen R-Faktor vermittelte ß-Laktamasen. Hierbei gehören die Klassen I, II und IV zu den chromosomalen und die Klassen III und V zu den plasmidalen Enzymen.
Heute sind fünfzehn plasmidcodierte ß-Laktamasen gram-

negativer Bakterien bekannt (Matthew 1979, Medeiros und Jacob 1982). Bei diesen Enzymen handelt es sich ausschließlich um konstitutiv produzierte Penicillinasen.
Chromosomal-codierte Penicillinasen treten vor allem bei Proteus (Jack und Richmond 1970) und Pseudomonas (Richmond und Sykes 1973) auf, chromosomale Cephalosporinasen finden sich hauptsächlich in Enterobacter (Hennessey 1968), Citrobacter (Sawai et al. 1968), Serratia (Sykes und Matthew 1976) und Pseudomonas (Sabath et al. 1965). Diese Cephalosporinasen liegen meist induzierbar vor. Breitspektrum-ß-Laktamasen (sowohl Penicillinase-, als auch Cephalosporinase-Aktivität) kommen überwiegend bei Klebsiella vor (Dale und Smith 1971). Die ß-Laktamasen gram-negativer Bakterien werden nicht, wie die gram-positiver Organismen, in das umgebende Medium abgeschieden, sondern befinden sich strategisch äußerst günstig angeordnet im periplasmatischen Raum (Neu und Winshell 1972).

Tabelle 1: Einteilung der ß-Laktamasen gram-negativer Bakterien nach Richmond und Sykes (1973)

Klasse	aktiv gegen		gehemmt durch	
	Cephalosporine	Penicilline	pCMB	clox
I	+	±	-	+
II		+	-	-
III	+	+	-	+
IV	+	+	+	-
V		+	-	-

Im Gegensatz zu den plasmid-codierten Penicillinasen wurde den chromosomalen Enzymen bei der Suche nach Ursachen für Resistenz zunächst nicht so viel Beachtung geschenkt, da das chromosomale ß-Laktamase-Gen nicht übertragen werden kann und diese Enzyme, bis auf wenige Ausnahmen, nur in geringen Mengen synthetisiert werden (Sykes und Matthew 1976).

Offensichtlich produzierten alle der untersuchten Mikroorganismen eine chromosomale ß-Laktamase und so sah man deren Bedeutung vor allem unter taxonomischen Gesichtspunkten (Matthew und Harris 1976).

Nachdem Bergström und Normark (1979) als erste die Funktion von Mutationen im chromosomalen ß-Laktamase-Gen bei E. coli bei Ampicillin-Resistenz untersucht hatten, beschäftigten sich zunehmend Arbeitsgruppen mit den molekularen Ursachen von Resistenz gegen zweite und vor allem dritte Generation Cephalosporine bei Enterobacter (Lampe et al. 1982), Citrobacter (Yamamoto et al 1983) und anderen Enterobakterien (Sanders und Sanders jr. 1979, Sanders et al. 1982). Diese Resistenz wird nicht durch R-Faktoren vermittelt, sondern tritt nach Mutation zur konstitutiven Produktion der chromosomal-codierten Cephalosporinase auf.
Dennoch ist ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Enzymmenge, bzw. Aktivität und Resistenz nicht immer gegeben (Ott et al. 1979).
Cephalosporinasen aus Proteus spp. hydrolysieren Cefotaxim und andere moderne Substanzen (Matsubara et al. 1981), so daß hier die Resistenz vornehmlich auf Inaktivierung beruht. Für die chromosomalen Enzyme der anderen Spezies wurde jedoch kein Abbau von Aminothiazolcephalosporinen nachgewiesen. In diesen Fällen vermuteten einige Autoren ein Zusammenspiel von ß-Laktamase und anderen Faktoren ("intrinsic factors") beim Zustandekommen von Resistenz (John et al. 1982).
Bei E. cloacae konnte schließlich eindeutig die chromosomale ß-Laktamase als Resistenzursache verantwortlich gemacht werden.
Schon 1969 war eine sensible Spontanmutante des hochresistenten E. cloacae P99, der eine Cephalosporinase des Typs Ia konstitutiv produziert, isoliert worden (Goldner et al. 1969). Diese Mutante $P99^{-}$ synthetisiert das Enzym nicht mehr und Richmond (1974) und Sanders et al. (1982) vermuteten hierin den Grund für Verlust der Resistenz.

Seeberg und Wiedemann (1984) gelang durch Klonierung des chromosomalen bla-Gens eines hochresistenten E. cloacae-Stammes (208) und Übertragung der Resistenz in einen sensiblen E. coli der Nachweis, daß Mutation zu geringerer Affinität der PBP's oder verminderter Permeabilität der äußeren Membran ausgeschlossen werden kann. Auch bei diesem Stamm ist die konstitutiv produzierte Cephalosporinase (ebenfalls Typ Ia) alleinige Ursache für Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika.

1.3. Entwicklung von ß-Laktamantibiotika

Die Abwandlung der Seitenketten von ß-Laktamantibiotika ermöglicht eine Anpassung an neue Erkenntnisse bezüglich Wirkungsweise (Christensen 1981, Salton 1981) und Resistenzentwicklung bei Mikroorganismen (Saikawa et al. 1981, Cama 1982). Nicht zuletzt müssen auch günstige Pharmakokinetik und Darreichungsform gewährleistet sein (O'Callaghan 1975).

1959 wurde das erste semisynthetische Penicillin, Phenethicillin eingeführt (siehe Hamilton-Miller 1982). Ihm folgten Methicillin, das sich durch hohe Stabilität gegen Penicillinasen von Staphylokokken auszeichnet und Ampicillin, welches den Erregerbereich auf die gram-negativen Organismen ausweitete. Die Iso-Oxazoyl-Penicilline, z.B. Oxacillin verfügen ebenfalls über gute Penicillinase-Stabilität. Anhand von Mezlocillin konnte gezeigt werden, daß der Austausch der α-Aminogruppe des Ampicillins durch eine Ureidogruppe die Erhöhung der antibakteriellen Aktivität vor allem gegen Pseudomonas spp. zur Folge hat (Bodey und Pan 1977). Daraufhin wurden eine Reihe weiterer Ureidopenicilline entwickelt (Saikawa et al. 1981).

1965 kam das erste semisynthetische Cephalosporin, Cephaloridin, in klinischen Gebrauch (siehe Hamilton-Miller 1982). Eine Vielzahl weiterer Cephalosporine folgte (O'Callaghan 1982) und sie werden heute in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 2). Diese Unterscheidung erfolgte nach zeitlicher Einführung und antibakterieller Aktivität (Dunn 1982).

Tabelle 2: Einige Vertreter der drei Generationen parenteraler Cephalosporine

Generation		
erste	zweite	dritte
Cephalothin	Cefotiam	Cefotaxim
Cephaloridin	Cefamandol	Ceftizoxim
Cefazolin	Cefoxitin	Ceftriaxon
Cephacetril	Cefuroxim	Ceftazidim

Die älteren Cephalosporine besitzen zwar ausgezeichnete Penetrationseigenschaften, sind jedoch sehr ß-Laktamase-labil, Penicillinasen (z.B. TEM-1), aber vor allem Cephalosporinasen (z.B. chromosomale Enzyme aus E. cloacae und P. aeruginosa) inaktivieren sie rasch (Sykes und Matthew 1976).
Die zweite Generation Cephalosporine, wie Cefamandol oder Cefuroxim weisen bereits größere Stabilität und damit höhere Aktivität auf (Dunn 1982), penetrieren aber schlechter durch die Bakterienmembran (Curtis et al. 1979). Einige (z.B. Cefoxitin) wirken als starke Induktoren der chromosomalen Cephalosporinase vieler Enterobakterien (Minami et al. 1981, Yotsuji et al. 1982).
Eine entscheidende Verbesserung gelang mit der Entdeckung von Cefotaxim (siehe Neu 1982). Die Einführung des Aminothiazoyl-Restes und einer Methoxyimino-Gruppe bewirkt eine hervorragende Stabilität gegen Penicillinasen und die meisten Cephalosporinasen. Cefotaxim wird allerdings im menschlichen Körper leicht zum Desacetyl-Derivat abgebaut, das geringere antibakterielle Aktivität besitzt (Limbert et al. 1982). Die Entwicklung weiterer Aminothiazol-Cephalosporine folgte. Ceftriaxon wird nicht so rasch metabolisiert, zeigt aber hohe Serumbindung (Neu 1981, Wise 1983). Ceftizoxim weist dagegen weder so hohe Serumbindung auf, noch wird es besonders schnell abgebaut (Kojo et al. 1979, Nakano und Kamiya 1981). Ceftazidim zeichnet sich durch verstärkte Pseudomonas-Aktivität und besonders gute Pene-

trationseigenschaften aus (Conzia et al. 1983).
Alle dritte Generation Cephalosporine haben eine hohe Affinität zu den PBP's I und III von E. coli (Richmond 1981). Die antibakterielle Wirkung gegen gram-positive Organismen und Pseudomonas spp. ist allerdings eingeschränkt (Dunn 1982).
Weitere moderne ß-Laktamantibiotika entstanden. So besitzt Latamoxef durch den Sauerstoff im sechsgliedrigen Ring anstelle des Schwefels bessere Penetrationsfähigkeit, die 7α-Methoxy-Gruppe verleiht dem Cephamycin ausgeprägte ß-Laktamase-Stabilität (Yoshida 1981).
Das Monobactam Azthreonam vereint Stabilität (Wise 1981) mit hoher Affinität vor allem zu PBP III (Sykes et al. 1981), und wirkt mit großem Erfolg gegen Penicillinase-Produzenten.
Das Carbapenem Thienamycin reagiert besonders intensiv mit PBP II (Spratt et al. 1977) und ist nach Einführung der N-Formimidoyl -Gruppe chemisch stabiler (Shannon und Phillips 1983). N,F-Thienamycin wird von ß-Laktamasen kaum hydrolysiert, im Tierversuch fand man jedoch Inaktivierung durch eine Dipeptidase. Um die Wirkung dieses Enzyms aufzuheben, ist die gleichzeitige Gabe eines Dehydropeptidase-Inhibitors notwendig (Norrby et al. 1983).
In jüngster Zeit sind vielversprechende ß-Laktamase-stabile Aminothiazol-Cephalosporine entwickelt worden (Lattrell et al. 1983), die im Gegensatz zu anderen dritte Generation Cephalosporinen kaum an ß-Laktamasen (Tolxdorff-Neutzling und Wiedemann 1983), aber mit hoher Affinität an die PBP's binden (Seeger et al. persönliche Mitteilung).

1.4. Fragestellung

Bislang wurde die Entwicklung neuer ß-Laktamantibiotika hauptsächlich von der Annahme bestimmt, daß die Hydrolyse durch ß-Laktamasen der wichtigste Grund für Resistenz sei. Nach Einführung von Cephalosporinen der zweiten und dritten Generation traten, trotz der "ß-Laktamase-Stabilität" dieser Substanzen, resistente E. cloacae-, C. freundii-, S. marcescens-Stämme u.a. auf. So waren laut einer PEG-Studie, Arbeitsgemeinschaft Resistenz, 1982 21% der untersuchten Enterobacter-, 12% der Citrobacter- und 11% der Serratia-Stämme Cefotaxim-resistent.
Diese Genera besitzen eine induzierbare, chromosomal-codierte ß-Laktamase, deren Gen zu konstitutiver Produktion mutieren kann (Findell und Sherris 1976).
Wie schon erwähnt, wurde bei E. cloacae nachgewiesen, daß die Überproduktion der Cephalosporinase und keine mutative Veränderung von PBP's oder Porinen für Resistenz gegen Cefotaxim u.a. verantwortlich ist (Seeberg und Wiedemann 1984).
Im Gegensatz zu den ß-Laktamasen von P. vulgaris (Okonogi et al. 1981) oder P. cepacia (Hirai et al. 1980) kann mit der Cephalosporinase aus E. cloacae keine signifikante Hydrolyse von Cefotaxim, Cefmenoxim u.a. gemessen werden (Richmond 1981, Mitsuhashi et al. 1981).
So ist zwar die Ursache, nicht aber der Mechanismus der Resistenz gegen die modernen ß-Laktamantibiotika bekannt. Aus diesem Grunde soll in der vorliegenden Arbeit der Resistenzmechanismus bei Cefotaxim-resistenten E. cloacae-Stämmen geklärt werden.

Ziele dieser Arbeit sind:

- Suche und Beschreibung von Parametern, die neben der ß-Laktamase-Aktivität Einfluß auf die Höhe der Resistenz haben,
- Reinigung und Charakterisierung der Cephalosporinase,
- Erstellung eines Modells, mit dem allgemeingültig die Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika geklärt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

UV-Spektralphotometer DB-G	Beckmann, Düsseldorf
Linseisschreiber L650	Linseis, Selb
Photometer Rhiele MK2 und Zusatzgerät SR 200	Rhiele KG, Berlin
Szintillationszähler plus Rechnersystem, Coru/matic 200	Tracerlab instruments Horst Kelm
Kühlzentrifuge, Cryofuge 20-3, Typ 5915	Hereus-Christ, Osterode
Ultrazentrifuge, Rotor VTi 70.1	Beckmann, Düsseldorf
Branson-Sonifier, B 12	Heinemann, Schwäbisch-Gemünd
Kühlzentrifuge Modell J2-21, Rotor JA-20	Beckmann, Düsseldorf
Gilson-Kolbenhubpipetten	Abimed, Düsseldorf
LKB-Multiphor 2117 und Power supply	LKB, Bromma, Schweden
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Kolbenhubpipetten feststehend	" "
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen

2.2. Chemikalien und Nährmedien

Trizma Base	Sigma, München
Visking Dialysierschläuche 8/32	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	" "
pCMb	" "
LKB-Fertiggele für Isoelektrofokussierung pH 3.5 - 9.5	LKB, Bromma Schweden
Szintillationsflüssigkeit Unisolve I	Zinsser, Frankfurt/M
HPTLC-Platten Kieselgel, F_{254}, 100 x 100 mm	Merck, Darmstadt
Desaga Chromatographiertank	Desaga, Heidelberg
" Spray Gun	" "

Whatman DE-52	
Standard I-Bouillion	Merck, Darmstadt
(= NI-Bouillion Nr 5443)	
Standard I-Agar	" "
(= NI-Agar Nr 5450)	
Isosensitest-Bouillion	Oxoid, Wesel
Nr CM 473	
Isosensitest-Agar	" "

Alle übrigen Chemikalien, soweit im Text nicht anders aufgeführt, wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

2.3. ß-Laktamantibiotika

Folgende Antibiotika wurden freundlicherweise von den Herstellern zur Verfügung gestellt:

Cephalothin	
Cephaloridin	
Cefazolin	Eli Lilly GmbH, Giessen
Cephacetril (Celospor)	
Cefamandol	
Latamoxef	
Cefoxitin	MSD, München
N,F-Thienamycin	
Clavulansäure	
Temocillin	Beecham-Wülfing, Gronau
Cefotiam	Ciba-Geigy, Basel
Cefoperazon	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Ceftriaxon	Hoffmann-LaRoche, Basel
Ceftizoxim	Fujisawa Ltd, Osaka, Japan
Ceftazidim	Glaxo, Greenford England
Nitrocefin	
Cefmenoxim	Grünenthal GmbH, Stolberg
Azthreonam	Squibb Inc

BMY 28142	Bristol-Myers
Cloxacillin	Bristol, Syracuse N.Y. USA
Mecillinam	Løvens, Kopenhagen
Cefotaxim Cefuroxim Desacetyl-Cefotaxim UP 1 / UP 2 HR 810 Penicillin G Ampicillin PADAC	Hoechst, Frankfurt
Mezlocillin Azlocillin Oxacillin	Bayer, Leverkusen
Piperacillin	Lederle, Wolfratshausen
Apalcillin	Thomae, Biberach

2.4. Zellanzucht

Vorkulturen

Von NI-Agarplatten wurde eine Einzelkolonie abgeimpft, in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 20 ml NI-Bouillion suspendiert und über Nacht bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Bei CTX^r-Organismen wurde den Vorkulturen 10 µg/ml Cefotaxim (außer bei Wachstumsversuchen) zugefügt.

Hauptkulturen

Den Hauptkulturen wurde grundsätzlich kein Antibiotikum zugesetzt.

Anzucht in 100-ml- Erlenmeyerkolben

Für Wachstumsversuche wurden 1 ml der Übernachtkultur in 50 ml NI-Bouillion überführt und wie unter 2.9 beschrieben im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Anzucht in 1000-ml-Erlenmeyerkolben

Für Herstellung von Enzymrohextrakten wurden 10 ml einer Vorkultur in 200 ml NI-Bouillion überführt, Inkubation erfolgte bei 37°C im Schüttelinkubator.
Zur Reinigung der ß-Laktamasen wurden je 2 x 500 ml NI-Bouillion mit 20 ml Übernachtkultur angeimpft.
Zur quantitativen Bestimmung der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 wurden 2 x 50 ml Vorkultur in einen Carboy mit 4.5 l NI-Bouillion überführt und unter Durchmischung mit Hilfe eines Magnetrührers bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.5. Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden auf NI-Agarplatten (bei CTX^r-Organismen mit 10 µg/ml Cefotaxim) bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und einmal im Monat neu überimpft.
Die Reinheitskontrolle erfolgte bei CTX^r-Stämmen durch Ausstreichen auf Antibiotika-freiem Agar.
Dauerkulturen wurden im Agarstichverfahren angelegt und die Reagenzgläser mit paraffingetränkten Korken verschlossen.

2.6. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgte nach der Methode des Mikrotiterverfahrens (Wilkinson 1978). Hierbei wurden Mikrotiterplatten mit Antibiotikalösung in geometrisch fallenden Konzentrationen beschickt und anschließend mit Bakteriensuspension beimpft.
Die Antibiotika wurden in sterilem aqua demin. gelöst und verdünnt. Die Bakterienvorkulturen wurden zunächst 1 : 100 in 0.9% iger NaCl-Lösung und kurz vor dem Beimpfen der Mikrotiterplatten noch einmal mit doppelter Isosensitest-Bouillion verdünnt. Somit entsprach die Einsaat ca. 10^5 Bakterien pro ml. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank. Das Ablesen der MHK geschah nach 19 h und ein zweites Mal nach 24 h.
Die minimale bakterizide Konzentration (MBK) wurde durch Überstempeln von den inkubierten Mikrotiterplatten auf

Antibiotika-freie Agarplatten bestimmt. Die Platten wurden bei 37°C bebrütet und nach 24 h abgelesen.

2.7. Übertragung von pBP100 durch Konjugation

Der Donor (*E. coli* BP100, CTX^r, Nx^s) und die Rezipienten (*E. coli* DC0 und DC2, CTX^s, Nx^r) wurden getrennt über Nacht bei 37°C angezogen, 1 : 20 in frischer NI-Bouillion verdünnt und etwa 2 h bei 37°C geschüttelt bis zu einer OD_{546} von 0.8. Anschließend wurden je 5 ml bei 5 000 Upm abzentrifugiert, das Sediment in einem kleinen Volumen Medium resuspendiert und Donor und der jeweilige Rezipient zu gleichen Teilen gemischt. Hiervon wurden 200 µl auf sterile Membranfilter verteilt, die auf frischen NI-Agarplatten lagen. Nach 3stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Mischkulturen in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit je 5 ml 0.9%iger NaCl von den Filtern gewaschen und auf Selektivplatten (10 µg/ml CTX, 15 µg/ml Nx) plattiert. Als Kontrolle wurden 200 µl des Donors und der Rezipienten einzeln ausplattiert.
Die Transkonjuganten wurden nach mindestens 12 h Inkubation bei 37°C mit dem Replica-Verfahren überprüft.

2.8. Resistenzprüfung im Replica-Verfahren

Die Löcher einer Mikrotiterplatte wurden mit je 200 µl NI-Medium gefüllt und die zu testenden Einzelkolonien mit sterilen Holzstäbchen darin suspendiert. Nach 6stündiger Bebrütung wurden die Klone mit einem sterilen Stempel auf Antibiotika-Agarplatten (10 CTX, 15 Nx, bzw. 10 CTX, 15 Nx, 20 Tet, 60 Kan, 20 Amp) übertragen. Wachstum nach 12 - 24 h zeigte Resistenz gegenüber den Antibiotika an.

2.9. Wachstumsversuche

Zugabe von ß-Laktamantibiotika zu Anfang des Wachstums

Je 50 ml NI-Medium in 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden verschiedenen Antibiotika in unterschiedlicher Konzentration zugefügt und mit den zu untersuchenden Organismen angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C. Alle Stunde wurde die OD_{546} und die Antibiotikum -

konzentration bestimmt. Hierfür wurden 1-ml-Proben entnommen, die Zellen durch Zentrifugation bei 15 000 Upm und 10 min entfernt und die Überstände im Agardiffusionstest auf noch vorhandende Menge an Antibiotikum geprüft.

Zugabe von ß-Laktamantibiotika während der exponentiellen Wachstumsphase

Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD_{546} von 1 unter Schütteln bei 37°C angezogen, jetzt erst die verschiedenen Antibiotikakonzentrationen zugefügt und die Kulturen wie zuvor weiter inkubiert. Der Anstieg der OD_{546} wurde ebenso wie die Konzentration alle Stunde bestimmt.

Zugabe von ß-Laktamantibiotika unter Beihaltung einer konstanten Zellzahl

Die Kulturen wurden bis zu einer OD_{546} von 1 angezogen, Antibiotikum zugefügt und bei 37°C ohne Schütteln mehrere Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen erfolgte kein wesentlicher Anstieg der optischen Dichte. Die Antibiotikum - konzentration wurde, wie schon zuvor beschrieben, alle Stunde bestimmt.

Die Herstellung von Vorkulturen und die Zellanzucht (Animpfung) erfolgte bei allen Wachstumsversuchen wie unter 2.4. beschrieben.

Messung der optischen Dichte (OD)

Das Wachstum der Bakterienkulturen konnte anhand der OD bei 546 nm photometrisch bestimmt werden. Gemessen wurde gegen einen Leerwert mit unbeimpften NI-Medium. Ab einer OD_{546} von 0.3 mußten die Proben verdünnt werden, da sonst keine Propotionalität zwischen Zellkonzentration und Absorption gegeben war.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der verwendeten Organismen bei einer OD_{546} von 1 wurde durch Ausspateln geeigneter Verdünnungen auf NI-Agarplatten und Bebrüten bei 37°C bestimmt.

2.10. Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest wurde im Lochtestverfahren durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung von Azthreonam und Ceftazidim diente *E. coli* DC0 als Indikatorstamm, für alle übrigen ß-Laktamantibiotika wurde *B. subtilis* verwendet.

Konzentrationsbestimmung mit E. coli DC0

500 µl einer Übernachtkultur von *E. coli* DC0 wurden in 500 ml, auf 50°C abgekühlten Isosensitest-Agar (pH 8.3) gegeben, gut durchmischt und je 10 ml in Petrischalen gegossen. Die Keimeinsaat entsprach somit 10^5 Bakterien pro 10 ml. Die Platten wurden immer frisch gegossen und sofort verbraucht. Für die Bestimmung wurden sechs Löcher mit einem Durchmesser von sechs Millimeter pro Platte ausgestanzt und in jedes Loch 20 µl Probe einpipettiert.
Vor der Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Platten für zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt. Hierdurch konnte das Wachstum einzelner Kolonien innerhalb der Hemmhöfe verhindert und scharfe Ränder erhalten werden.
Nach 18 h war der Indikatorstamm zu einem gleichmäßigen Rasen ausgewachsen, die Hemmhofdurchmesser wurden bestimmt und anhand einer Eichkurve die jeweilige Konzentration der Proben errechnet, wobei in der Eichkurve der ln der Antibiotika-Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmhöfe aufgetragen wurde.

Konzentrationsbestimmung mit B. subtilis

Für die Konzentrationsbestimmung mit *B. subtilis* konnte eine Sporensuspension verwendet werden. 500 ml auf 60°C abgekühltem Isosensitest-Agar (pH 8.3) wurde soviel einer Sporensuspension zugefügt, daß 10^5 Zellen pro 10 ml vorlagen. Herstellung, Beschicken und Ablesen der Agarplatten erfolgte wie oben beschrieben. Nach 8 h Inkubation bei 37°C wurden die Platten übernacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag sofort ausgewertet.

Herstellung einer B. subtilis Sporensuspension

B. subtilis wurde über Nacht bei 37°C in NI-Medium angezogen,

je ein ml auf fünf NI-Agarplatten (sehr hoch gegossen) ausgespatelt und die Platten acht Tage bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Platten mit je 10 ml sterilem aqua demin abgeschwemmt und die Suspension 45 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Hiernach erfolgte Zentrifugation bei 10 000 Upm und 10 min. Das Pellet wurde drei mal in aqua demin. gewaschen und zum Schluß in 10 ml aufgenommen. Diese Suspension wurde erneut 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und anschließend die Sporenzahl (wie Zellzahlbestimmung) ermittelt. Die Sporensuspension konnte in kleinen Portionen eingefroren und bis zur Verwendung bei -18°C aufbewahrt werden.

2.11. Herstellung von Enzymrohextrakten

Zellernte

Die Hauptkulturen (vgl. 2.4.) wurden bei einer OD_{546} von 1 abgeerntet. Zunächst erfolgte eine Zentrifugation von 10 min bei 10 000 Upm. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ml 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 gewaschen und erneut 10 min bei 10 000 Upm sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 ml desselben Puffers resuspendiert und bei -18°C im Gefrierfach aufbewahrt.

Zellaufschluß

Die aufgetauten Zellen wurden mit einem Ultraschalldesintegrator bei max. Generatorleistung und einer Temperatur von 4°C aufgeschlossen. Die Beschallzeit betrug 4 x 15 sec/20 ml, um ein Aufheizen zu vermeiden wurden Pausen von 30 sec eingelegt. Zur Entfernung von Zelltrümmern und intakten Zellen erfolgte nach dem Beschallen eine Zentrifugation bei 18 000 Upm und 20 min. Der klare Überstand wurde als Rohextrakt definiert und für die Bestimmung von Enzymaktivität und Enzymaffinität verwendet.

2.12. Proteinbestimmung

Ganze Zellen (nach Stickland 1951)

Aus dem Kulturmedium abzentrifugierte Zellen wurden einmal mit 2 ml 0.75%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 6.6 ml aqua demin und 1.2 ml NaOH (20%) versetzt und 5 min im 100°C-Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen im Eisbad wurden 0.2 ml $CuSO_4$-Lösung (25%) hinzugegeben und mit einem Glasstab verrührt.
Nach 30 min Inkubation bei Zimmertemperatur und anschließender Zentrifugation erfolgte die Extinktionsbestimmung der Überstände bei 546 nm gegen eine Leerwert. Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit 0 - 15 mg RSA.

Rohextrakte (nach Lowry et al. 1951, modifiziert nach H.A. Barker)

200 µl Probe (10 - 200 µg Protein) wurden mit 2 ml alkalischem Kupferreagenz vermischt, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend mit 0.2 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz (frisch 1 + 2 verdünnt) versetzt. Nach 20 min wurde die Extinktion bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen. Eine Eichkurve wurde mit RSA im Bereich von 0 - 200 µg Protein/Ansatz aufgenommen.

Alkalisches Kupferreagenz

0.8 ml 2% $CuSO_4$ x 5 H_2O
0.8 ml 4% K,Na-Tartrat x 4 H_2O
38.4 ml 3% Na_2CO_3-Lösung in 0.1 N NaOH

Verdünnte Proteinlösungen (nach Warburg und Christian 1941)

Diese Bestimmungsmethode wurde nur bei angereicherten Enzymlösungen angewendet. Die Extinktion der Probe wurde in einer Quarzküvette bei 260 und 280 nm gegen 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 gemessen und die Proteinkonzentration nach folgender Formel (Kalckar 1947) errechnet:

$$\text{Protein mg/ml} = 1.55 \times E_{280} - 0.75 \times E_{260}$$

Mit Hilfe der Extinktion bei 280 nm wurden auch die Elutionsmaxima in den Säulenfraktionen bei der Enzymreinigung gemessen.

2.13. Bestimmung der ß-Laktamase-Aktivität

Spektrophotometrische Methode (nach O'Callaghan et al. 1968)

Hierbei machte man sich die Tatsache, daß der ß-Laktamring im UV-Bereich absorbiert zunutze. Bei einer bestimmten Wellenlänge konnte die hydrolytische Spaltung von Cephalosporinen anhand der Abnahme der Extinktion gemessen werden. Die für das jeweilige ß-Laktamantibiotikum optimale Wellenlänge wurde durch Vergleich der Spektren (300 - 190 nm) von intakter und mit ß-Laktamase oder NaOH hydrolysierter Substanz ermittelt. Eine Differenz zeigte sich dort, wo der ß-Laktamring absorbiert hatte, für den Enzymtest wurde die Wellenlänge gewählt, bei der der größte Extinktionsunterschied auftrat. Das Absorptionsmaximum der sogenannten "ß-Laktamase-stabilen"-Cephalosporine wurde mit 0.4 M NaOH (Cefotaxim, Cefuroxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim, Cefoperazon, Latamoxef und Cefoxitin) oder 1 M NaOH (Ceftazidim und das Monobactam Azthreonam) bestimmt. Der spektrophotometrische Test wurde, außer für Ampicillin, nicht mit Penicillinen durchgeführt, da deren Spaltprodukt im Bereich des ß-Laktamrings absorbierte.

Die Hydrolyse eines Substrats (100 µM) wurde bei geeigneter Wellenlänge und 37°C in K,Na-Phosphat-Puffer 0.05 M, pH 7.0 gegen Puffer gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet, das Enzym bei Bedarf verdünnt.

Testansatz: 850 µl 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0
100 µl 1000 µM Substrat
50 µl Enzym

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\frac{\Delta E}{\varepsilon \times \text{min} \times \text{ml}} = \text{U/ml}$$

ΔE = Extinktionsdifferenz
ε = Extinktionskoeffizient
U = Units (Enzymeinheit)

Die Enzymaktivität wurde auf einen ml Enzymrohextrakt bezogen. Der Extinktionskoeffizient des Substrats bei der verwendeten Wellenlänge wurde bestimmt, indem man die Extinktion verschiedener Konzentrationen ermittelte und ε anhand der

Formel $E = \varepsilon \times c \times d$, wobei c die Konzentration des Substrats und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm) war, berechnete.

Mikrojodometrische Methode (nach Sykes und Nordström 1972)

Bei der Hydrolyse von Penicillinen entsteht als Spaltprodukt eine Säure, die mit Jod reagieren kann. Im mikrojodometrischen Test wird die noch vorhandene Menge Jod photometrisch ermittelt und hieraus die bei der Hydrolyse gebildete Säure berechnet, die proportional zur Enzymaktivität ist. Diese Methode kann nicht mit Cephalosporinen durchgeführt werden, da bei deren Hydrolyse, in Abhängigkeit vom C_3-Rest, weitere saure oder basische Spaltprodukte entstehen können.

Enzymtest: 100 µl 0.4 M Substrat (im Test 0.2 M)
100 µl verdünnte Enzymlösung
5 min bei 37°C inkubieren, abstoppen der Enzymreaktion durch
200 µl 5 M Na-Acetat-Puffer pH 3.6
anschließend 200 µl Jod-Stärke Farbreagenz zufügen, gut mischen und gegen Antibiotikums-Leerwert bei 620 nm die Extinktion messen.
Weiterhin muß ein Leerwert für Jod-Stärke ohne Antibiotikum und ohne Enzym bestimmt werden.

Jod-Stärke-Farbreagenz

240 µM J_2 + 4.8 mM KJ-Lösung werden 1 : 6 mit aqua demin verdünnt und mit 0.8%iger Stärkelösung 1 : 1 vermischt.
Die Stärkelösung muß vor Gebrauch aufgekocht und wieder abgekühlt werden.

Berechnung der Enzymaktivität:

$E_{\text{Leerwert mit Antibiotikum}} - E_{\text{Probe}} = \Delta E$

Der Jodkonzentration im Testansatz ($E_{\text{Jod-Stärke allein}}$) entsprechen 0.03 µM Penicillin.
Anhand von ΔE kann diejenige Menge ermittelt werden, die vom der ß-Laktamase pro Minute abgebaut wurde. Die Aktivität wird dabei auf einen ml Enzymrohextrakt bezogen (U/ml).

Mikrobiologischer Test (nach Sykes und Matthew 1979)

Bei dieser Methode wurde die verbliebene Menge Substrat nach Einwirkung von ß-Laktamase im Agardiffusionstest mit B. subtilis als Indikatorstamm (siehe 2.10.) ermittelt und hieraus die Enzymaktivität bestimmt. Diese sehr empfindliche Methode wurde für Aminothiazol-Cephalosporine und N,F-Thienamycin angewandt. Bei Azthreonam, Ceftazidim und Latamoxef mußte E. coli DC0 als Indikatorstamm verwendet werden.

Enzymtest: 100 µl 10 mM Substrat in 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0
900 µl konz. Enzymrohextrakt

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Wasserbad, alle 5 bzw. 10 min wurden 100 µl Probe entnommen und in 900 µl J/KJ-Lösung abgestoppt. 20 µl der abgestoppten Proben wurden im Agardiffusionstest (siehe 2.10.) auf Antibiotikums-Konzentration untersucht und die Enzymaktivität anhand einer Eichkurve ermittelt. Der Umsatz wurde auf einen ml Enzymrohextrakt bezogen (U/ml).

J/KJ-Lösung

178 mg J_2 wurden in 100 ml 0.6%iger KJ-Lösung gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

Definition der Enzymaktivität

Als eine Enzymeinheit (unit) wurde diejenige Enzymaktivität bezeichnet, bei der 1 µmol Substrat pro Minute bei 37°C und in 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 umgesetzt werden konnte. Die Enzymaktivität von 1 ml Enzymrohextrakt oder 1 ml angereichertem Enzym wurde angegeben.

µmol/min x ml = U/ml

Bei der spezifischen Aktivität wurde die ß-Laktamase-Aktivität auf mg Protein pro ml bezogen.

2.14. Bestimmung der ß-Laktamase-Affinität (nach Schindler 1980)

Als Maß für die Affinität eines ß-Laktamantibiotikums zu einer ß-Laktamase fand der I_{50}-Wert (µg/ml) Verwendung. Als I_{50}-Wert wurde diejenige Menge an Antibiotikum bezeichnet, welche die Hydrolyse eines Substrates zu 50% hemmte.

Bestimmung der Affinität von Cephalosporinasen

Testansatz: 750 µl 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 7.3
100 µl 0.6 mM PADAC (in dem gleichen Puffer)
100 µl zu testendes Antibiotikum (Inhibitor)
50 µl verdünntes Enzym

Die Hydrolyse von PADAC ohne und in Gegenwart verschiedener "Inhibitor"-Konzentrationen wurde bei 578 nm und 37°C verfolgt. In einem Diagramm wurden % Hemmung gegen Konzentration "Inhibitor" aufgetragen und aus der so erhaltenen Kurve der I_{50}-Wert abgelesen.
Bei Bestimmung des I_{50}-Wertes von Aminothiazol-Cephalosporinen wurde wahlweise auch Cephalothin als zu hemmendes Substrat verwendet. Diese Messungen fanden bei 270 nm, 37°C und in 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 statt.

Bestimmung der Affinität von Penicillinasen

Testansatz: 750 µl 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0
100 µl 10 mM Ampicillin
100 µl zu testendes Antibiotikum (Inhibitor)
50 µl verdünntes Enzym

Die Extinktionsabnahme (Hydrolyse) von Ampicillin wurde mit und ohne "Inhibitor" bei 235nm und 37°C im Photometer verfolgt. Die Berechnung des I_{50}-Wertes erfolgte wie oben beschrieben.

Je höher die Affinität eines ß-Laktamantibiotikums zu einer ß-Laktamase war, desto geringer die Menge die für eine 50ig % Hemmung benötigt wurde. Mit dieser Affinitätsbestimmung konnte die Kompetition um die Substratbindestelle der ß-Laktamase beobachtet werden.

2.15. Bestimmung der Kryptizität von ß-Laktamasen

Um die Verborgenheit (Kryptizität) einer ß-Laktamase zu bestimmen, wurde die Enzymaktivität ganzer Zellen (V_{intact}) mit Cephalosporinen der vollständig durch Ultraschall aufgeschlossener Zellen ($V_{sonicated}$) gegenübergestellt.
Die Bakterienkulturen wurden bis zu einer OD_{546} von 1 angezogen. Bei der Messung von V_{intact} mit Cefotaxim und Azthreonam wurden unverdünnte Bakteriensuspensionen eingesetzt, bei Cephalothin die Zellen 1 : 100 mit Medium verdünnt, bei Cephaloridin 1 : 50, mit Cefotiam 1 : 25 und mit Cefamandol 1 : 2. Die Inkubation erfolgte 2, 5, 10 und 15 min bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln. Die Antibiotika-Konzentrationen reichten von 0.025 mM bis 4 mM.
Die Zellen wurden nach Abstoppen der Reaktion in Eiswasser durch Zentrifugation bei 15 000 Upm und 5 min entfernt und die Überstände im Agardiffusionstest (siehe 2.10.) auf verbliebenes Antibiotikum getestet.
V_{intact} wurde als µg umgesetztes Substrat/ min x ml Bakteriensuspension bei OD_{546} von 1 berechnet.
$V_{sonicated}$ wurde spektrophotometrisch, bzw. bei Azthreonam und Cefotaxim durch die mikrobiologische Methode ermittelt.
$V_{sonicated}$ wurde als µg hydrolysiertes Substrat/min x ml aufgeschlossene Bakteriensuspension von OD_{546} gleich 1 berechnet.

$V_{sonicated}/V_{intact}$ = Kryptizität der ß-Laktamase

2.16. Aufnahme von C^{14}-markiertem Cefotaxim

Je 20 ml NI-Bouillion wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur von E. coli DC0, DC2, DC0 Tk und DC2 Tk angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{546} von 1 im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden 64, bzw 32 µg/ml kaltes Cefotaxim und 50 µl (400 000 cpm) radioaktives Cefotaxim zugefügt.
Die Radioaktivität im Testansatz entsprach somit 20 000 cpm/ml. Die Inkubation der Bakterienzellen fand bei Zimmertemperatur statt, alle 5 min wurde eine Probe von 1 ml genommen, über Membranfilter abgesaugt und 4 mal mit je 1 ml

K,Na-Phosphat-Puffer 0.05 M, pH 7.0 + 64 µg/ml kaltes Cefotaxim gewaschen. Anschließend wurden die Filter 10 min bei 100°C getrocknet und in 20 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die cpm der Proben wurden 3 x 4 min gezählt, und ein Filterleerwert, sowie ein Standard erstellt.
Die Aufnahme von Cefotaxim konnte aus den Δcpm-Werten errechnet werden.

2.17. Berechnung der periplasmatischen Konzentration von ß-Laktamantibiotika (nach Zimmermann und Rosselet 1977)

Die Konzentration an freiem Antibiotikum im periplasmatischen Raum (s_p) hängt ab von der Anzahl Moleküle, die durch die äußere Membran gelangen (V_{intact}), von der Affinität des Antibiotikums zur ß-Laktamase und vom maximalen enzymatischen Umsatz durch die ß-Laktamase (V_{max}). Als ß-Laktamase-Affinität wurde nicht der K_M-Wert, sondern der I_{50}-Wert eines Antibiotikums eingesetzt.
Die periplasmatische Konzentration berechnet sich dann wie folgt:

$$V_{intact} = \frac{V_{max} \times s_p}{I_{50} + s_p}$$

$$s_p = (V_{intact} \times I_{50}) / (V_{max} - V_{intact}) \quad \{\mu g/ml\}$$

2.18. Bestimmung des Penetrationsparameters C (nach Zimmermann und Rosselet 1977)

Der Penetrationsparameter ist ein Maß für die Penetrationsfähigkeit eines ß-Laktamantibiotikums und errechnet sich nach:

$$C = \frac{s_p \times V_{max}}{s_p + I_{50}} / (s_a - s_p) \quad \{min^{-1}\}$$

Hierbei ist s_a die Konzentration des Antibiotikums im umgebenden Medium.

2.19. Analytische Isoelektrofokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit LKB-Polyacrylamidfertiggelen mit Trägerampholyten von pH 3.5 - 9.5 vorgenommen. An den Enden der Gele wurden Elektrodenstreifen aufgelegt, die gleichmäßig mit 1 M H_3PO_4 (Anodenflüssigkeit) und 1 M NaOH (Kathodenflüssigkeit) gesättigt waren. Mit Hilfe eines Silikonapplikatorstreifens wurden je 5 µl Probe im Abstand von 5 mm aufgetragen. Die Isoelektrofokussierung wurde bei gleichmäßiger Kühlung bei 4°C durchgeführt. Die Laufzeit betrug 1.5 h bei 1500 V, 50 mA und 30 W.
Zur selektiven Anfärbung der ß-Laktamase wurde nach dem Lauf ein mit Nitrocefin-Lösung getränktes Filterpapier (Whatman P54) auf das Gel gelegt. Durch Spaltung des ß-Laktamrings des Nitrocefins konnten die ß-Laktamasen als rotgefärbte Banden sichtbar gemacht werden und mit ß-Laktamasen bekannten IP's verglichen werden.

Nitrocefin-Lösung

5 mg Nitrocefin wurden in 0.5 ml DMSO und 9.5 ml 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 gelöst, in kleinen Portionen eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut.

2.20. Reinigung der ß-Laktamasen

Zellaufschluß

Je ein Liter Hauptkultur wurden bei einer OD_{546} von 1 abgeerntet, gewaschen und das Sediment in 10 ml K,Na-Phosphat-Puffer 0.05 M, pH 7.0 aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -18°C aufbewahrt. Der Aufschluß erfolgte durch Ultrabeschallung. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (siehe auch 2.11.) und der klare gelblichbraune Überstand über Nacht gegen ein großes Volumen 0.03 M Tris-HCl-Puffer pH 7.3, bzw 8.0 dialysiert. Das Dialysat wurde als Rohextrakt definiert.

Ultrazentrifugation

Der zellfreie Rohextrakt wurde einer 2-stündigen Ultrazentrifugation bei 140 000 g unterzogen. Im Sediment befanden sich die gefärbten Membran-gebundenen Bestandteile, im Überstand das lösliche Protein.

DE 52-Cellulose-Ionenaustausch-Chromatographie

Der Ultrazentrifugationsüberstand wurde einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Zur Bereitung des Gels wurden 10 g in 100 ml 0.03 Tris-HCl-Puffer pH 7.3 oder 8.0 suspendiert, 5 mal mit dem gleichen Puffer gewaschen und im Exsikkator entgast. Das Gelmaterial wurde anschließend in selbstgefertigte Säulen (Plastikspritze) von 2.5 cm Durchmesser und 8 cm Länge gegossen (blasenfrei). Das Volumen der Säule betrug 20 ml, zum Äquilibrieren diente obiger Puffer. Die Chromatographie wurde für ß-Laktamasen, deren IP bei 8.8 lag mit Tris-HCl-Puffer des pH's 8.0, für ß-Laktamasen,deren IP bei 7.8, bzw 8.0 lag mit Puffer des pH's 7.3 durchgeführt. Die Extrakte wurden aufgetragen und mit dem jeweiligen Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen, die aktiven Fraktionen durch ΔE-Messung mit 0.06 mM PADAC bei 578 nm ermittelt und gesammelt.

Sephacryl-300-Chromatographie

Das fertig vorgequollene Gel (Pharmacia, Freiburg) wurde in 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0 suspendiert, entgast,in eine Säule von 2 cm Durchmesser und 60 cm Länge gegossen und mit dem gleichen Puffer + 0.1 M NaCl äquilibriert.
Der Extrakt wurde aufgetragen und mit selbigen Puffer eluiert. Mit einer Gilson-Peristaltik-Pumpe wurde eine konstante absolute Flußrate von 19 ml/h eingestellt, dies entsprach einer linearen Flußrate von 6.05 cm/h. Die Laufzeit betrug 8 - 10 h. Zur Aufzeichnung von Elutionsdiagrammen diente ein Pharmacia UV-1 mit angeschlossenem Schreiber.
Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen aufgefangen und die aktiven Fraktionen durch ΔE-Messung mit 0.06 mM PADAC

bei 578 nm ermittelt. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und in einer Amicon-Kammer mit einem Satorius-Filter Typ SM 145/39 auf 3 - 4 ml eingeengt.

Sephadex-G 75-Chromatographie

Das Gelmaterial (Pharmacia) wurde 24 h in 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0 gequollen, entgast, in eine Pharmacia K15/90-Säule gepackt und mit dem gleichen Puffer + 0.1 M NaCl äquilibriert und eluiert. Mit derPeristaltik-Pumpe wurde eine konstante Flußrate von ca. 6 ml/h eingestellt, welche einer linearen Flußrate von etwa 3.4 cm/h entsprach.
Das weitere Vorgehen, Auftragen der Proben und Sammeln der Fraktionen, sowie Einengen der aktiven Fraktionen, erfolgte wie unter Sephacryl-300-Chromatographie beschrieben.

2.21. Bestimmung von enzymatischen Parametern

K_s-Werte wurden durch Lineweaver-Burk-Auftragung (1934) und Hanes-Plot (1932) ermittelt, K_i-Werte durch Dixon-Auftragung bestimmt. Bei Hemmstudien wurde der jeweilige Inhibitor dem Testansatz zugefügt und die Reaktion mit Enzym gestartet. Es erfolgte keine Vorinkubation von Substrat und Enzym, oder Enzym und Inhibitor.

2.22. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung und Analyse von Hydrolyseprodukten der Cephalosporine wurde auf 10 x 10 cm HPTLC-Kieselgel-60-Platten mit Fluoreszenzindikator F_{254} ausgeführt. Als Laufmittel diente im allgemeinen Aceton/Acetat/Wasser (95:5:2). Für den Nachweis von Aminosäuren wurde Butanol/Acetat/Wasser (60:15:25) verwendet. Die Auftragung von je 5 µl Probe erfolgte mit einer Kapillaren auf der Startlinie, die Platten wurden anschließend im warmen Luftstrom getrocknet und die Chromatographie in 40 ml des Laufmittels in gesättigter Atmosphäre in einer Trennkammer durchgeführt, bis sich die Lauffront 1 cm unterhalb der Oberkante der DC-Platte befand. Die Lauffront wurde nach der Chromatographie mit Bleistift markiert, die Platten an der Luft getrocknet und anschließend im UV-Licht (255 nm)

detektiert. Die Flecke wurden mit Bleistift markiert und R_F-Werte berechnet. Der R_F-Wert einer Substanz ist ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit und ist definiert als:

$$R_F = \frac{\text{Strecke : Startpunkt Substanzfleck}}{\text{Strecke : Startpunkt Lösungsmittelfront}}$$

Zum Nachweis von Aminosäuren erfolgte Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühlösung und anschließender Nachbehandlung bei 100°C bis zur optimalen Farbentwicklung.

Ninhydrin-Lösung

0.3 g Ninhydrin wurden in 100 ml Butanol und 3 ml Essigsäure gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.23. Ermittlung der UV-Spektren von Hydrolyse-Produkten

Zur Erstellung der UV-Spektren der Spaltprodukte von Cephalosporinen wurden je 10 µl Probe aufgetragen, 15 min in Aceton/Acetat/Wasser chromatographiert, im UV-Licht detektiert und mit Bleistift die Flecke markiert. Mit einer scharfen Rasierklinge wurden die einzelnen Flecke ausgekratzt, in Eppendorfgefäße gegeben und mit 1 ml 0.05 M K,Na-Phosphat-Puffer pH 7.0 suspendiert. Das Kieselgel wurde bei 10 min und 15 000 Upm abzentrifugiert und die Spektren der Überstände im UV-Spektralphotometer (190 - 300 nm) gegen Puffer als Leerwert bestimmt.

2.24. SDS-Gelelektrophorese

Zur genauen Bestimmung des Molekulargewichts wurde eine Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen nach Weber (1972) durchgeführt. Der Enzymextrakt nach S 300-Chromatographie wurde hierfür verwendet.

Herstellung und Zusammensetzung der Gele:

Lösungen: Acrylamidlösung 11.1 g Acrylamid + 0.3 Bis in 50 ml H_2O

Gel-Puffer Na-Phosphat 0.2 M, pH 7.0 + 0.2 % SDS

Persulfatlösung 15 mg/ml Aqua demin.

Gelzusammensetzung: 6.75 ml Acrylamidlösung, 6.75 ml Aqua demin 15 ml Gelpuffer, 1.5 ml Persulfat, 0.045 TEMED (entspricht 5 % Acrylamid)
Probenpuffer: 10 mM Na-Phosphat, pH 7.0 + 1 % SDS + 1 % (V/V) Mercaptoäthanol: 9.9 ml Gelpuffer, 100 mg SDS, 0.1 ml Mercaptoäthanol.
Reservoirpuffer: 750 ml Gel-Puffer, 750 ml Aqua demin., 14 g SDS.
Probenvorbereitung:
100 µl ß-Laktamase + 300 µl Probenpuffer,
Eichproteine der Boehringer Combithek zur SDS-Gelelektrophorese (Nr. 161365) 50 µl + 450 µl Probenpuffer, 3 min bei 100°C koche
Durchführung der Elektrophorese:
Pro Röhrchen wurden 100 µl ß-Laktamaseprobe (20 µg Protein), bzw. 50 µl Eichproteine (5 µg Protein) aufgetragen, 5 µl Bromphenolblaulösung und 5 µl konz. Mercaptoäthanol zugefügt. Zur Identifizierung der Banden dienten Kontrollröhrchen mit den Eichproteinen. Die Elektrophorese wurde zunächst mit 2 mV, dann mit 8 mV Stromstärke pro Röhrchen bei Zimmertemperatur durchgeführt (Elektrophoreseapparatur von Desaga,Heidelberg).
Anfärbung:
Färbelösung: Coomassie Blue R-250 (Serva) 0.25 g, Methanol 45 ml, Eisessig 9 ml, Aqua demin. 46 ml.
Färbedauer: 20 - 40 Minuten, je nach Proteinkonzentration
Entfärbung: Über Nacht in einem Methanol-Eisessig-Wasser-Gemisch (50:75:875)
Fixierung: In 7 %iger Essigsäure
Auswertung:
Aus der Auftragung log des Molekulargewichts der Eichproteinuntereinheiten gegen ihre elektrophoretische Mobilität (EM) ergab sich eine Eichgerade, aus der das Molekulargewicht der ß-Laktamasen bestimmt werden konnte.

2.25. "peptide-mapping"der ß-Laktamasen (nach Cleveland 1977)

Pronase-Verdauung:

Je 100 µl Original-Probe wurden mit 10 µl 87 % Glycerin und 4 µl 15 % SDS versetzt. Anschließend wurden die Proben 2 min gekocht, abgekühlt und 10 µl Pronase-Lösung (1 mg/ml) zugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte Zugabe von 12 µl Mercaptoäthanol und 13 µl 15 % SDS. Die ß-Laktamase-Probe enthielt somit vor Inkubation 0.5 % SDS und hinterher 2 % SDS und 10 % Mercaptoäthanol.

Die Gelelektrophorese, Anfärbung und Auswertung erfolgten wie unter 2.24. beschrieben.

Pro Röhrchen wurden 100 µl aufgetragen und als Frontmarker dienten 5 µl Bromphenolblau in 40 % Saccharose-Lösung.

3. Ergebnisse

3.1. Herkunft und Auswahl der Bakterienstämme

Für die Untersuchung der biochemischen Grundlagen der Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika wurden E. cloacae-Stämme verwendet, die im Zeitraum Mai 1977 - Mai 1981 im Rahmen einer überregionalen Studie der Arbeitsgemeinschaft Resistenz, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie eV (1978, 1980 und 1982) an der Universitätsklinik Bonn isoliert worden waren.
Vier der ausgewählten Stämme zeichneten sich durch Resistenz gegen Cefotaxim und andere moderne Cephalosporine aus. Die Organismen bildeten alle eine konstitutive Cephalosporinase (Seeberg et al. 1983). Fünf der Stämme wiesen Resistenz gegen Cefoxitin, nicht aber gegen Cefotaxim auf. Sie besaßen eine induzierbare Cephalosporinase. Anhand der IP's erfolgte eine Einteilung der Enzyme in E. cloacae-ß-Laktamase A und B (Tabelle 3).

Tabelle 3: Resistenz der verwendeten E. cloacae-Stämme und IP ihrer ß-Laktamasen

E. cloacae Stamm	Resistenz	IP der ß-Laktamase	Typ der ß-Laktamase
208		8.8	A
5	CTX^r	7.8	B
159		7.8	B
2091		7.8	B
352W*		8.0	B'
149W		8.8	A
988W	CTX^s	8.8 + 5.6	A + TEM-2
150W		7.8 + 5.4	B + TEM-1
314W		8.8 + 5.4	A + TEM-1
P99		7.8	B
55M**	CTX^r	7.8	B
GN7471		8.4	-

* W = Wildtyp, ** M = Mutante

Von den fünf CTX^S E. cloacae-Stämmen wurden Mutanten erhalten, die ebenfalls gegen Cefotaxim resistent waren (Seeberg et al. 1983). Die Mutation führte zur konstitutiven Produktion der ß-Laktamase.
Vergleichend wurden drei Cefotaxim-resistente E. cloacae-Stämme, GN7471 (Minami et al. 1980), 55M (Gootz et al. 1982) und P99 (Richmond und Sykes 1973) aus Japan, USA und England mituntersucht, sowie P. cepacia 7946 (Beckmann 1983) und E. coli W3110 mit der Penicillinase TEM-1 (Matthew 1979).
Für Penetrationsstudien wurden E. coli DC0, mit intakter äußerer Membran und die Mutante DC2 mit einem Defekt der äußeren Membran und daraus resultierender besserer Penetration von Antibiotika verwendet (Richmond et al. 1976).

3.2. MHK-Werte von Cephalosporinen und Penicillinen

Die Höhe der Resistenz bei den ausgewählten Organismen wurde mit Hilfe der Mikrodilution für Cephalosporine der ersten, zweiten und dritten Generation, sowie für ältere und neuere Penicilline bestimmt.

CTX^R-klinische Isolate von E. cloacae

Alle Stämme zeichneten sich durch hohe Resistenz gegen Cefotaxim und andere Aminothiazol-Cephalosporine, sowie das Cephamycin Latamoxef aus (Tabelle 4). Die MHK mit HR810 und BMY28142, ebenfalls Aminothiazol-Derivate, war sehr viel niedriger, hier wurde keine Resistenz ausgebildet.
E. cloacae GN7471 wies allgemein geringere MHK-Werte für die vorliegenden Penicilline und Cephalosporine auf (Tabelle 4).

Ansonsten zeigten die untersuchten Bakterienstämme auch gegen Acyl-Ureidopenicilline und das Monobactam Azthreonam hohe Resistenz (Tabelle 4). Nur die MHK mit dem Amidinopenicillin Mecillinam und dem Carbapenem N,F-Thienamycin war deutlich niedriger. E. cloacae GN7471 wies in diesem Falle als einziger Stamm Resistenz gegen Mecillinam auf, bei E. cloacae 208 lag die MHK bei nur 2 µg/ml, die MBK aber bei 512 µg/ml.
Insgesamt war die MBK der untersuchten ß-Laktamantibiotika entweder gleich der MHK, oder lag eine Titerstufe höher.

Tabelle 4: MHK von ß-Laktamantibiotika bei klinischen E. cloacae-Isolaten (CTX^r) und Literaturstämmen

Antibiotika {µl/ml}	E. cloacae-Stamm 208	5	159	2091	P99	55M	GN7471
Cephaloridin	2048	2048	1024	2048	1024	2048	1024
Cephalothin	8192	16384	16384	16384	16384	>32769	8192
Cefazolin	2048	8192	8192	8192	4096	8192	1024
Cefotiam	256	512	512	256	512	1024	256
Cefoxitin	2048	256	512	256	256	256	512
Cefamandol	512	1024	1024	1024	1024	2048	512
Cefuroxim	2048	512	512	512	512	1024	256
Cefoperazon	32	64	64	32	128	256	8
Cefotaxim	64	64	64	64	128	512	32
Desacetyl-CTX	512	1024	1024	1024	1024	2048	512
HR810	1	1	1	1	4	8	0.5
BMY28142	0.06	1	1	0.5	1	1	0.125
Ceftizoxim	64	32	64	32	128	256	32
Ceftriaxon	64	64	64	64	256	256	16
Ceftazidim	64	32	64	32	128	256	16
Cefmenoxim	32	16	32	8	64	128	4
Latamoxef	32	16	32	16	16	16	8
Penicillin G	>2048	>2048	>2048	>2048	>2048	>2048	>2048
Ampicillin	1024	2048	2048	2048	1024	2048	512
Oxacillin	512	512	512	512	512	512	256
Mecillinam	2	0.5	1	0.5	0.5	2	256
Piperacillin	32	64	64	32	256	256	16
Azlocillin	512	2048	2048	2048	2048	2048	512
Mezlocillin	32	64	32	16	128	128	8
Temocillin	16	16	8	8	32	32	8
N,F-Thienamycin	0.5	0.5	0.25	0.25	0.125	0.25	1
Apalcillin	128	n.b.	n.b.	128	>128	n.b.	32
Azthreonam	32	16	16	16	32	32	8

n.b. = nicht bestimmt

P. cepacia zeigte vergleichbar hohe MHK-Werte für die getesteten Penicilline und Cephalosporine, wies aber deutlich höhere Resistenz gegen Mecillinam (>512 µg/ml), Temocillin (256 µg/ml), N,F-Thienamycin (>64 µg/ml) und Azthreonam (>128 µg/ml) auf, die Werte für Penicillin G und Ampicillin lagen jedoch nur bei 256 µg/ml.

CTX^s-klinische Isolate von E. cloacae und deren CTX^r-Mutanten

Die Cefotaxim-sensiblen Wildtypen 149W und 352W wiesen bereits Resistenz gegen erste und zweite Generation Cephalosporine auf (Tabelle 5). Nach Mutation zur Cefotaxim-Resistenz stieg die MHK mit diesen Substanzen ebenfalls deutlich an. Die Wildtypen 150W, 314W und 988W waren nicht so ausgeprägt empfindlich gegen Cefotaxim wie 352W und 149W. Nach Mutation zur konstitutiven Enzymproduktion war aber auch bei diesen Stämmen ein signifikanter Anstieg der MHK-Werte zu verzeichnen.
Mit älteren und modernen Penicillinen, sowie Azthreonam konnte ebenfalls eine Erhöhung der MHK-Werte bei den Mutanten gemessen werden (Tabelle 6). Gegen N,F-Thienamycin und Mecillinam wurde keine Resistenz ausgeprägt. Einzige Ausnahme waren 314W und 314M, die hohe MHK mit Mecillinam wurde auf das Vorhandensein der Penicillinase TEM-1 in diesen Stämmen zurückgeführt.

E. coli DC0 und DC2 ohne und mit pBP100, sowie E. coli BP103

In E. coli DC0 und DC2, die keine ß-Laktamase in größere Menge produzieren konnten, wurde das Plasmid pBP 100 mit dem Gen, das die Cephalosporinase aus E. cloacae 208 codierte (Seeberg 1983), durch Konjugation übertragen.
Mit diesen Transkonjuganten sollten Untersuchungen zum Einfluß der äußeren Bakterienmembran als Penetrationsbarriere auf die Höhe der Resistenz durchgeführt werden.
Nach Aufnahme des Plasmids, wiesen die zuvor sensiblen E. coli-Stämme DC0 und DC2 hohe Resistenz gegen die getesteten Cephalosporine (Tabelle 7) und Penicilline auf. E. coli DC2 mit der defekten äußeren Membran zeigte nach Erwerb des Resistenzplasmids um eine Stufe niedrigere MHK-Werte, als

Tabelle 5: MHK von Cephalosporinen bei klinischen E. cloacae-Isolaten (CTX^S) und deren Mutanten (CTX^r)

Cephalosporine {µg/ml}	E. cloacae-Stämme									
	352W	M	149M	M	150W	M	314W	M	988W	M
Cephaloridin	512	2048	512	2048	2048	4096	1024	16384	1024	1024
Cephalothin	64	8192	32	16384	>8192	>8192	8192	32768	>8192	>8192
Cefazolin	64	4096	1	4096	4096	8192	4096	8192	2048	8192
Cefotiam	<1	1024	<1	1024	128	2048	64	2048	16	1024
Cefoxitin	64	512	512	1024	256	512	256	1024	128	512
Cefamandol	2	1024	4	2048	1024	4096	1024	4096	128	1024
Cefuroxim	8	1024	8	512	512	1024	64	1024	256	1024
Cefoperazon	<0.125	128	0.125	128	32	128	128	256	<0.5	64
Cefotaxim	0.25	256	0.25	128	8	128	2	256	4	128
Desacetyl-CTX	2	2048	2	1024	256	1024	64	2048	16	2048
HR810	0.03	4	0.03	2	8	32	4	32	0.25	32
BMY28142	0.03	2	0.06	1	0.5	0.5	1	1	0.06	0.25
Ceftizoxim	0.25	128	<0.25	64	8	128	<0.25	128	2	128
Ceftriaxon	<0.25	256	0.5	256	128	256	4	512	4	128
Ceftazidim	0.25	128	0.25	64	32	64	2	128	8	128
Cefmenoxim	0.125	64	0.25	32	2	128	1	128	0.5	64
Latamoxef	0.25	32	0.25	64	<4	64	32	128	8	32

Tabelle 6: MHK von Penicillinen bei klinischen E. cloacae-Isolaten (CTX^s) und deren Mutanten (CTX^r)

Penicilline {µg/ml}	E. cloacae-Stämme									
	352		149		150		314		988	
	W	M	W	M	W	M	W	M	W	M
Penicillin G	256	>2048	1024	>2048	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1024	>2048
Ampicillin	16	2048	16	2048	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	32	2048
Oxacillin	256	512	256	512	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	256	512
Mecillinam	0.5	1	0.5	1	1	2	>1024	>1024	0.5	1
Piperacillin	<1	256	1	32	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1	32
Azlocillin	16	2048	16	2048	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	8	1024
Mezlocillin	2	128	4	64	4	64	>1024	>1024	8	128
Apalcillin	4	>128	2	128	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Temocillin	2	32	2	16	8	32	8	32	4	8
N,F-Thienamycin	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	1	0.5	1	2	2
Azthreonam	<0.03	32	<0.03	32	16	32	1	64	1	32

n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 7: MHK von ß-Laktamantibiotika mit *E. coli* DC0 und DC2 mit und ohne pBP100, sowie *E. coli* BP103

Antibiotika (µg/ml)	*E. coli*-Stämme DC0	DC2	DC0 Tk*	DC2 Tk	BP103
Cephaloridin	2	2	512	128	128
Cephalothin	16	2	2048	1024	1024
Cefazolin	2	2	2048	1024	2048
Cefotiam	0.007	0.007	512	256	128
Cefoxitin	2	0.5	2048	1024	2048
Cefamandol	1	0.06	1024	512	128
Cefuroxim	4	0.125	2048	2048	1024
Cefoperazon	0.06	0.007	128	64	16
Cefotaxim	0.06	0.007	128	64	64
Desacetyl-CTX	0.25	0.06	2048	1024	1024
HR810	0.03	0.015	8	4	2
BMY28142	0.03	0.007	1	0.5	0.125
Ceftizoxim	0.06	0.015	128	64	64
Ceftriaxon	0.125	0.015	256	128	32
Ceftazidim	0.125	0.06	256	128	128
Cefmenoxim	0.06	0.0035	64	32	32
Latamoxef	0.25	0.125	32	16	16
Penicillin G	32	1	>2048	>2048	n.b.
Ampicillin	2	0.25	>2048	>2048	n.b.
Oxacillin	128	0.5	>2048	>2048	n.b.
Mecillinam	0.5	0.01	512	128	n.b.
Piperacillin	1	0.03	2048	1024	n.b.
Azlocillin	8	0.06	>2048	>2048	n.b.
Mezlocillin	2	0.025	1024	512	n.b.
Apalcillin	n.b.	n.b.	>128	>128	n.b.
Temocillin	8	4	128	64	n.b.
N,F-Thienamycin	0.125	0.06	0.25	0.25	n.b.
Azthreonam	0.06	0.015	64	64	64

*Tk = Transkonjuganten mit pBP100

E. coli DC0 Tk, zudem wuchs Stamm DC2 Tk deutlich schlechter. Die MHK-Werte beider Stämme korrelierten weitgehend mit denen von *E. cloacae* 208, Unterschiede ergaben sich vor allem für Cephaloridin und Cephalothin. Die MHK dieser Substanzen lag bei DC0 Tk und DC2 Tk 2 - 3 Titerstufen, die MBK 4 - 5 Stufen niedriger als bei *E. cloacae* 208. Die Resistenz gegen dritte Generation Cephalosporine und auch gegen HR810 und BMY28142 lag bei den Transkonjuganten um etwa 1 - 2 Stufen höher als bei *E. cloacae* 208.

Die Resistenz gegen einige Penicilline war bei den *E. coli*-Transkonjuganten höher als bei Stamm 208 (Tabelle 7). Dies wurde auf die ebenfalls durch pBP100 codierte Penicillinase TEM-2 zurückgeführt.

E. coli BP103 mit dem klonierten bla-Gen aus Stamm 208 wurde vergleichend mitgetestet (Tabelle 7). Die MHK-Werte lagen im selben Bereich wie die von *E. coli* DC0 Tk und *E. cloacae* 208, obwohl pBP103 ein multi-copy-Plasmid war und bis zu dreimal mehr ß-Laktamase produzierte (Tabelle 8).

Tabelle 8: Enzymaktivität der *E. cloacae* ß-Laktamase A aus *E. coli* BP103 und *E. cloacae* 208

Antibiotikum	Enzymaktivität {U/ml} der ß-Laktamase aus *E. coli* BP103	*E. cloacae* 208
Cephaloridin	41	17.2
Cefotaxim	0.125	0.031
Ceftazidim	0.04	0.014
Cefmenoxim	0.057	0.026

3.3. Wachstumsversuche

Der Einfluß von Cefotaxim, Azthreonam und Latamoxef auf wachsende Kulturen von E. cloacae 208, 5, 352M, 149M, sowie E. coli DC0 Tk und DC2 Tk sollte untersucht werden. Verschiedene subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen wurden den Kulturen entweder direkt zu Anfang des Wachstums, oder nach Erreichen einer optischen Dichte von 1 (Tabelle 9) während der exponentiellen Wachstumsphase, zugefügt.
Das weitere Wachstum wurde anhand der OD_{546} verfolgt. Gleichzeitig fand eine Bestimmung der Konzentration an Antibiotikum im Medium statt.

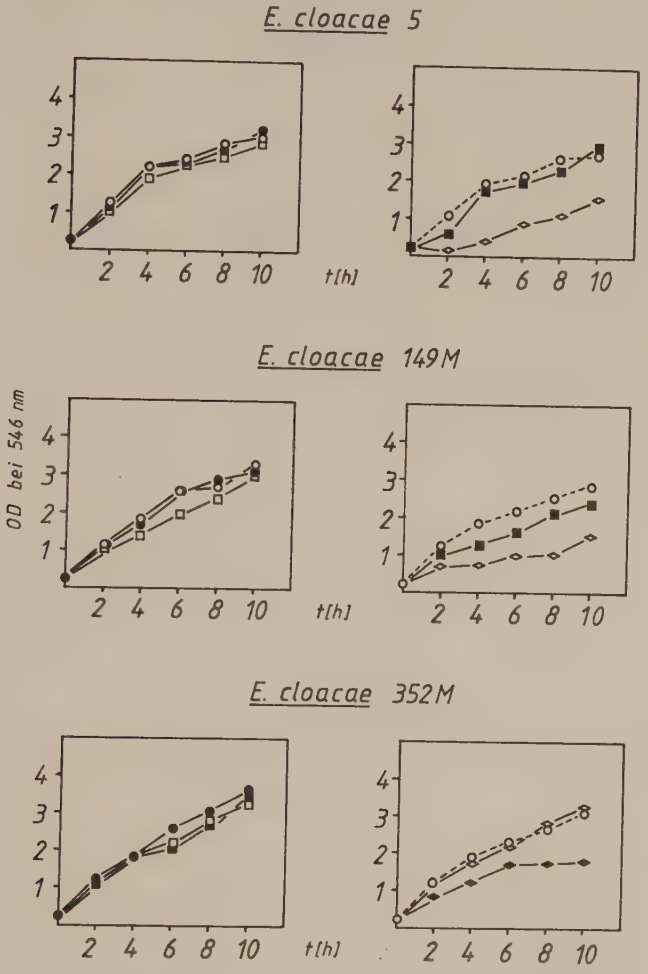
Tabelle 9: Zellzahl der verwendeten Orgnismen bei OD_{546} von 1

Organismus	Zellzahl (Zellen x 10^8/ml)
E. cloacae 208	6.2
" 5	5
" 352M	5
" 352W	5.7
" 149M	6.6
" 149W	5.9
E. coli DC0 Tk	5.4
" DC2 Tk	4.2

3.3.1. Wachstum in Gegenwart verschiedener CTX-Konzentrationen

Den Bakterienkulturen wurde bei einer OD_{546} von 0.01 je 8, 16, 32, 64, 128 und bei E. cloacae 352M auch 256 µg/ml Cefotaxim zugefügt. Als Kontrolle diente jeweils eine Kultur ohne Antibiotikum.
Bei E. cloacae 5 konnte mit 8, 16 und 32 µg/ml kein wesentlicher Unterschied im Wachstum, verglichen mit der Kontrolle ohne Cefotaxim, gemessen werden (Abb. 7). Mit 8 und 16 µg/ml wurde ab der 5. Stunde sogar besseres Wachstum beobachtet. In Gegenwart von 64 µg/ml erfolgte zunächst schlechteres Wachstum, nach 4 h verlief die Wachstumskurve aber wie die

Abb. 7: Wachstum von E. cloacae 5, 149M und 352M in Gegenwart verschiedener Cefotaxim-Konzentrationen



○-○ = 8 µg/ml, ●-● = 16 µg/ml, □-□ = 32 µg/ml,
■-■ = 64 µg/ml, ◇-◇ = 128 µg/ml, ◆-◆ = 256 µg/ml,
○---○ = Kontrolle

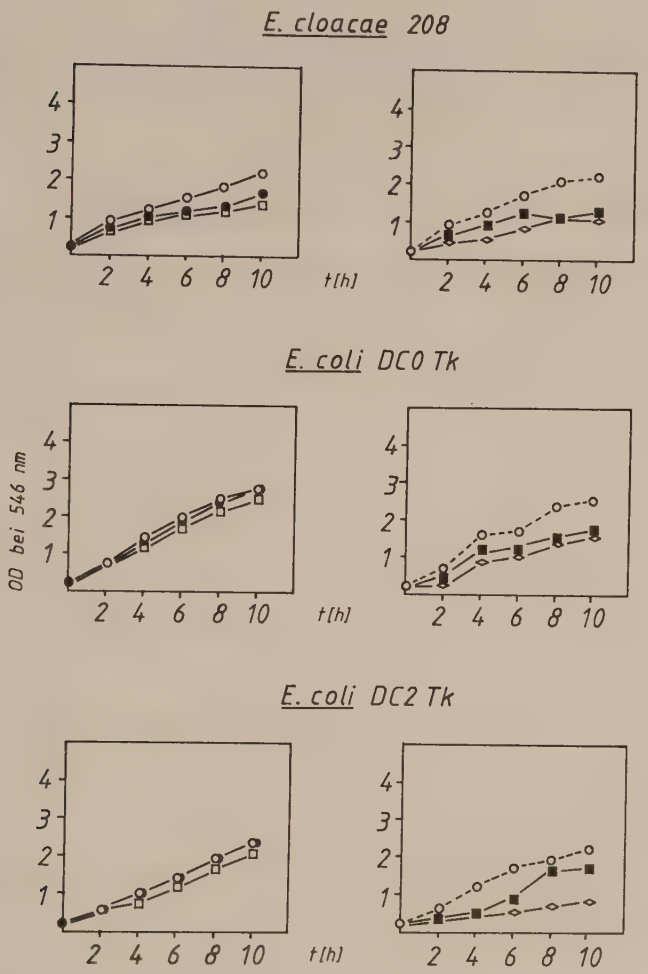
Der Versuch wurde in NI-Standard-Bouillion durchgeführt, bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad.

der Kontrolle. Bei Zugabe von 128 µg/ml Cefotaxim trat eine deutliche Beeinflußung auf, die OD stieg nur noch langsam an, selbst nach 10 h war sie niedriger als die der Kontrolle. Bei E. cloacae 352M hatten subinhibitorische Konzentrationen einen leicht wachstumsfördernden Einfluß ab der 5. Stunde. Lediglich 256 µg/ml Cefotaxim, welche der MHK entsprachen, bewirkten Wachstumsverschlechterung.
Bei E. cloacae 149M übten 128 µg/ml den größten Einfluß aus, aber auch mit niedrigeren Konzentrationen wurde Wachstumshemmung beobachtet. So trat mit 64 µg/ml erst nach 8 h besseres Wachstum auf, mit 32 µg/ml näherte sich die Wachstumskurve ab der 6. Stunde der der Kontrolle.

Der Einfluß von Cefotaxim auf das Wachstum war bei E. cloacae 208 am ausgeprägtesten (Abb. 8). Nur mit 8 µg/ml fand sich kein wesentlicher Unterschied zur Kontrolle,mit 128 µg/ml, die der MHK entsprachen, trat ab der 2. Stunde eine Stagnation ein, 3 Stunden später stieg die OD wieder kontinuierlich an, blieb aber auch nach 10 Stunden deutlich unter der der Kontrolle. Eine Untersuchung der Zellmorphologie zeigte, daß ab der 5. Stunde bei 64 µg/ml und 128 µg/ml Cefotaxim intensive Filamentbildung auftrat. Bei 32 µg/ml und 16 µg/ml fanden sich deutlich weniger Filamente, bei 8 µg/ml konnte keine Filamentbildung beobachtet werden.
E. coli DC0 Tk und DC2 Tk verhielten sich bei Wachstum in Gegenwart von Cefotaxim etwas anders als E. cloacae 208. So hatten bei den Transkonjuganten nur 128 und 64 µg/ml wachstumshemmenden Einfluß. Die Penetrationsmutante DC2 Tk wuchs zwar ingesamt schlechter als DC0 Tk und eine Stimulierung des Wachstums in Gegenwart von 8 und 16 µg/ml trat nicht auf, aber die Störung war dennoch nicht so ausgeprägt wie bei E. cloacae 208.

Die Wirkung von Cefotaxim wurde durch das Alter der Vorkulturen und die Art des Mediums beeinflußt. Bei Wachstum in Isosensitest-Bouillion, der, im Gegensatz zu NI-Standard-Bouillion, p-Aminobenzoesäure fehlte, konnte eine Verstärkung der Wachstumshemmung auch bei niedrigen Konzentra-

Abb. 8: Wachstum von E. cloacae 208, E. coli DC0 Tk und E. coli DC2 Tk in Gegenwart verschiedener Cefotaxim-Konzentrationen

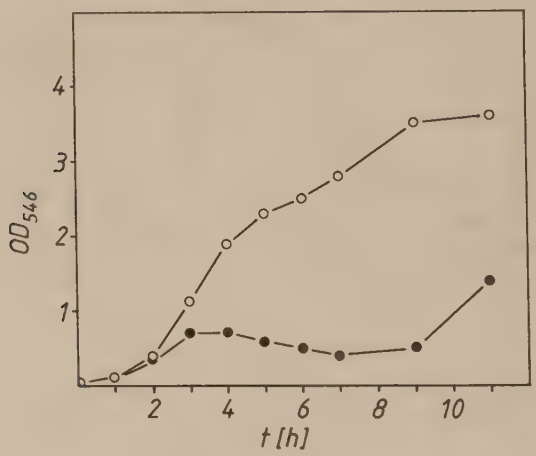


○-○ = 8 µg/ml, ●-● = 16 µg/ml, □-□ = 32 µg/ml,
■-■ = 64 µg/ml, ◇-◇ = 128 µg/ml, ○---○ = Kontrolle
Der Versuch wurde in NI-Standard-Bouillion durchgeführt, bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad.

tionen beobachtet werden. Bei Verwendung einer zwei Tage alten Vorkultur, anstelle der sonst üblichen Übernachtkultur, fand in Gegenwart hoher Konzentrationen Cefotaxim signifikant schlechteres Wachstum statt.

In Abb. 9 ist das Wachstum des Cefotaxim-sensiblen Wildtypen 149W (MHK von Cefotaxim = 0.25 µg/ml) in Gegenwart von 2 µg/ml Cefotaxim dargestellt. Eine Beeinträchtigung trat auch hier erst ab der 3. Stunde auf. Die OD fiel deutlich ab, der erneute Anstieg nach 10 h wurde auf Mutation zur Cefotaxim-Resistenz zurückgeführt.

Abb. 9: Wachstum von E. cloacae 149W in Gegenwart von 2 µg/ml Cefotaxim



●-● = 2 µg/ml, o-o = Kontrolle

Der Versuch wurde in NI-Standard-Bouillion durchgeführt, bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad.

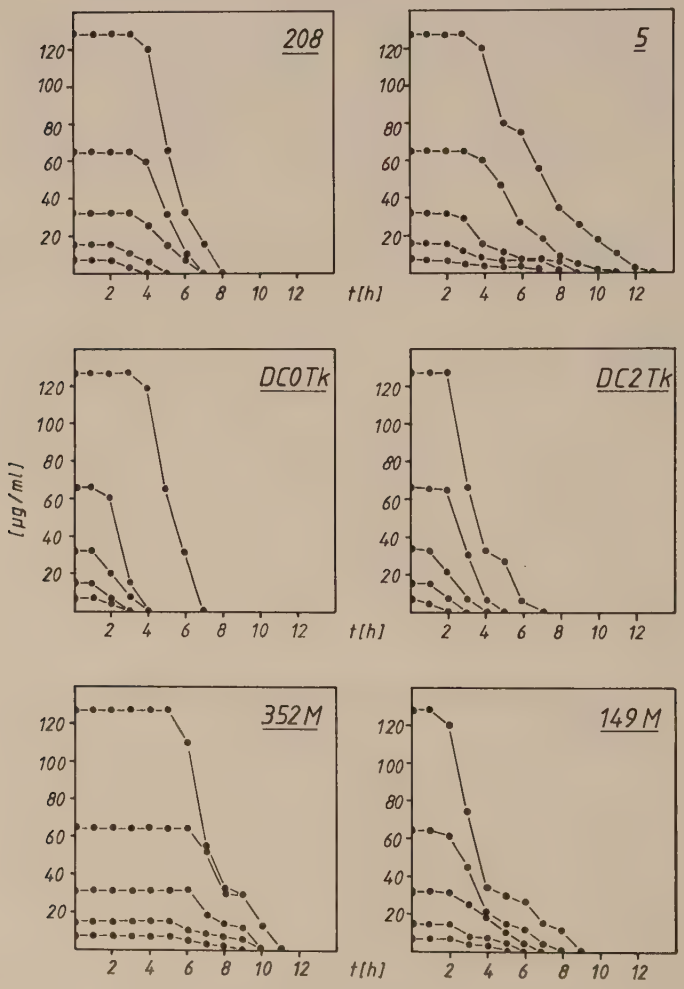
3.3.2. Abnahme von Cefotaxim während des Wachstums

Die Bestimmung der Cefotaxim-Konzentration im Medium wurde parallel zur Meßung der optischen Dichte (3.3.1.) durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob und in welchem Maße Cefotaxim im Verlauf des Wachstums abgebaut werden kann. Als Kontrolle diente unbeimpftes Medium mit 64 µg/ml, um nicht-enzymatische Vorgänge auszuschließen.
In der Kontrolle war auch nach 24 h keine Verringerung an Cefotaxim festzustellen, d.h. ein selbständiger Zerfall konnte ausgeschlossen werden.
Bei E. cloacae 352M, der ohne große Beeinträchtigung in Anwesenheit von Cefotaxim wuchs, wurde erst nach 6 h eine signifikante Abnahme gemessen (Abb. 10). Bei Stamm 5 erfolgte Abbau ab der 3. Stunde, bei Stamm 149M schon ab der 2. Stunde. E. cloacae 208 war wie E. cloacae 149M in der Lage Cefotaxim relativ rasch abzubauen, nach 4 - 5 h konnte bei 8, bzw 16 µg/ml Anfangskonzentration kein Cefotaxim mehr im Medium nachgewiesen werden, bei 32 und 64 µg/ml nach 7 Stunden und mit 128 µg/ml nach 8 Stunden.
Verglichen mit E. cloacae 208 verschwand bei den Transkonjuganten das Cefotaxim schneller aus dem Medium, vor allem die niedrigen Konzentrationen wurden von E. coli DC2 Tk rascher abgebaut.

3.3.3. Nachweis des enzymatischen Abbaus von Cefotaxim

Um nachzuweisen, daß für den Cefotaxim-Abbau während des Wachstums die Cephalosporinase der Organismen verantwortlich war, wurden die Proben aller Kulturen mit 128 µg/ml Anfangskonzentration Cefotaxim dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Standard dienten 128 µg/ml Cefotaxim und Medium ohne Cefotaxim, um Verwechslungen mit Bestandteilen der Bouillion auszuschließen.
In Abb. 11 sind stellvertretend die Befunde für E. cloacae 352M und 149M dargestellt, bei denen Cefotaxim sehr langsam, bzw. sehr rasch abgebaut worden war.
Bei allen Stämmen nahm die Intensität des Cefotaxim-Flecks

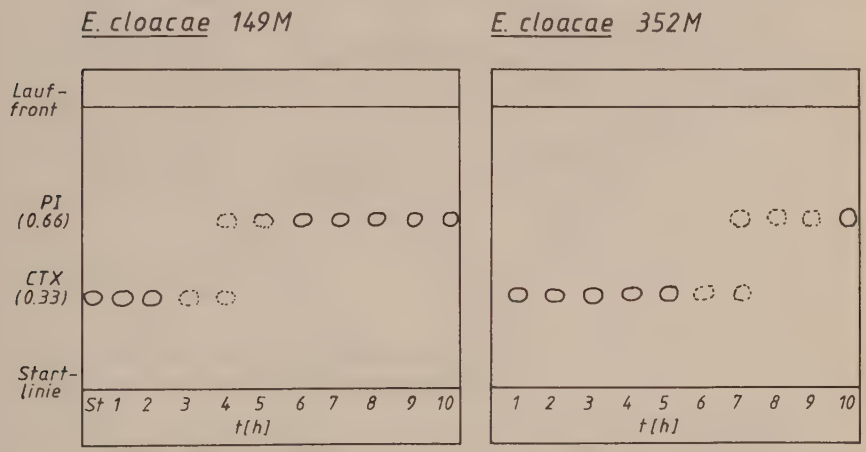
Abb. 10: Abnahme von Cefotaxim während des Wachstums bei E. cloacae 5, 149M, 352M, 208, E. coli DC0 Tk und E. coli DC2 Tk



Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Agardiffusionstest, als Indikatorstamm diente B. subtilis.

(R_F-Wert 0.33) in Korrelation zur Abnahme der Konzentration im Medium ab. Konnte im Medium kein Cefotaxim mehr nachgewiesen werden, trat ein neuer Fleck mit einem R_F-Wert von 0.66 auf. Hierbei handelte es sich wie unter 3.7.1. noch eingehend beschrieben werden wird, um ein typisches Spaltprodukt des Cefotaxims, welches beim hydrolytischen Abbau durch die Cephalosporinasen entstanden war.

Abb. 11: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Proben mit 128 µg/ml Anfangskonzentration Cefotaxim

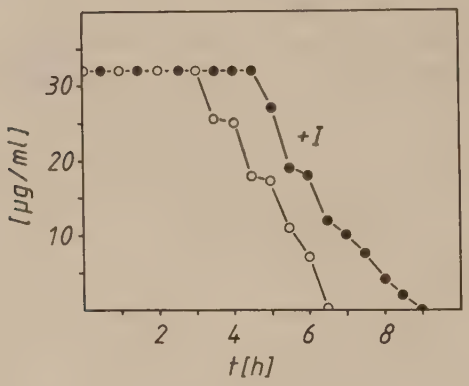


St = Standard, das Medium absorbierte nicht bei 255 nm, deshalb wurde es nicht aufgeführt.
Die Chromatographie wurde auf 10 x 10 cm Kieselgel 60 HPTLC-platten mit F_{254} in Aceton/Acetat/H_2O (95 : 5 : 2) durchgeführt, die Flecke bei 255 nm unter einer UV-Lampe detektiert.

Durch Reduktionsvorgänge im aktiven Zentrum übt J/KJ-Lösung eine inaktivierende Wirkung auf viele ß-Laktamasen aus (Citri und Pollock 1966). Deshalb wurden, zum weiteren Beweis für den enzymatischen Abbau von Cefotaxim, einer Kultur von E. cloacae 208 (mit einer OD_{546} von 1) 32 µg/ml Cefotaxim und 0.1 mM J/KJ-Lösung zugefügt. Bei konstanter Zellzahl wurde

während des Versuchs die Abnahme an Cefotaxim verglichen mit einer Kontroll-Kultur ohne J/KJ-Lösung (Abb. 12). Unter Einfluß des Inhibitors erfolgte der Abbau von Cefotaxim langsamer, erst nach 9 h konnte kein Antibiotikum mehr nachgewiesen werden, ohne Inhibitor war bereits nach 6.5 h alles Cefotaxim verschwunden.

Abb. 12: Hemmung des Abbaus durch 0.1 mM J/KJ-Lösung bei E. cloacae 208 (32 µg/ml Cefotaxim)

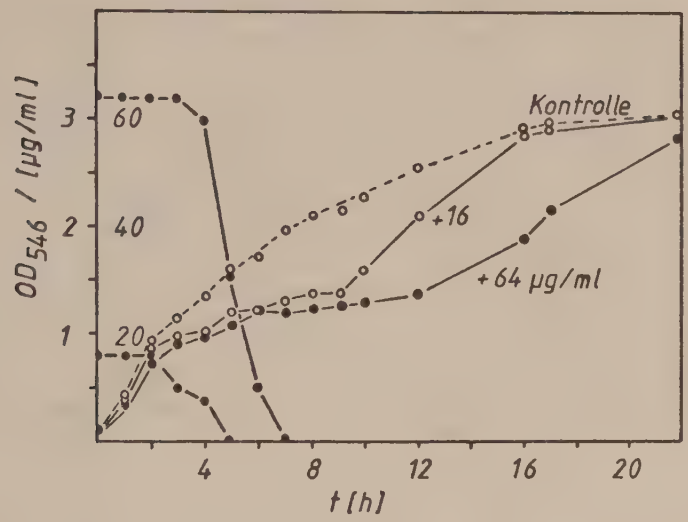


Der Versuch wurde in NI-Standard-Bouillion bei 37°C ohne Schütteln im Wasserbad durchgeführt. Die Konzentration an Cefotaxim wurde im Agardiffusionstest mit B. subtilis als Indikatorstamm bestimmt.

3.3.4. Postantibiotischer Effekt (PAE) von Cefotaxim

Ein langsamer Wiederanstieg des Wachstums konnte bei E. cloacae 208 erst 4 Stunden nach Verbrauch des Cefotaxims beobachtet werden. Bei Inkubation mit 64 µg/ml Cefotaxim erreichte die Kultur auch nach 20 h nicht ganz die optische Dichte der Kontrolle (Abb. 13). Dieser postantibiotische Effekt trat auch bei den anderen Organismen auf, wenn inhibitorische Konzentrationen in Bereich der MHK verwendet wurden.

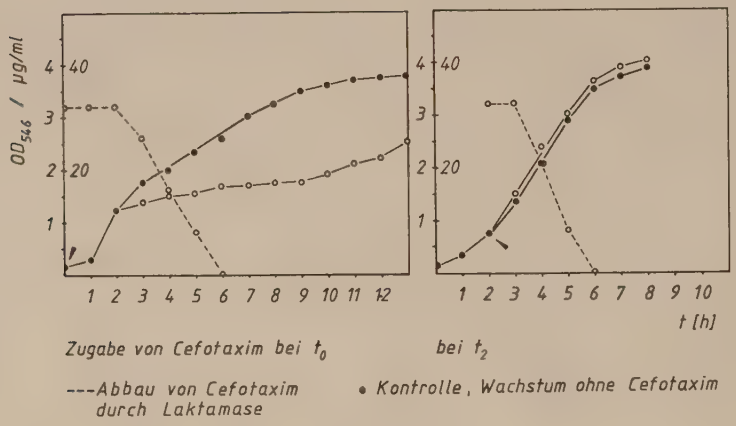
Abb. 13: Postantibiotischer Effekt von Cefotaxim (64 µg/ml) bei E. cloacae 208



3.3.5. Einfluß und Abbau von Cefotaxim nach Zugabe in der exponentiellen Wachstumsphase

Wachsenden E. cloacae-Kulturen wurde nach 2 Stunden bei einer OD_{546} von 1 je 32 µg/ml Cefotaxim zugefügt, das weitere Wachstum, sowie der Abbau des Antibiotikums verfolgt. Unter diesen Bedingungen trat keine Beeinträchtigung des Wachstums von E. cloacae 208 auf (Abb. 14). Mit den anderen E. cloacae-Stämmen, 5, 149M, 352M, 2091 und 159 wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Die vorgegebene Menge Cefotaxim wurde im gleichen Zeitraum (etwa vier Stunden) abgebaut, wie bei Zugabe des Antibiotikums von Anfang des Wachstums an (siehe 3.3.2.), dort erfolgte steter Cefotaxim-Abbau auch erst nach Erreichen einer OD_{546} von 1.
Nach Zugabe von 32 µg/ml Ceftriaxon bei einer OD_{546} von 1 erfolgte wie bei Cefotaxim keine Wachstumsstörung, innerhalb von 4 - 5 Stunden war Ceftriaxon abgebaut.

Abb. 14: Einfluß von 32 µg/ml Cefotaxim auf das Wachstum von E. cloacae 208

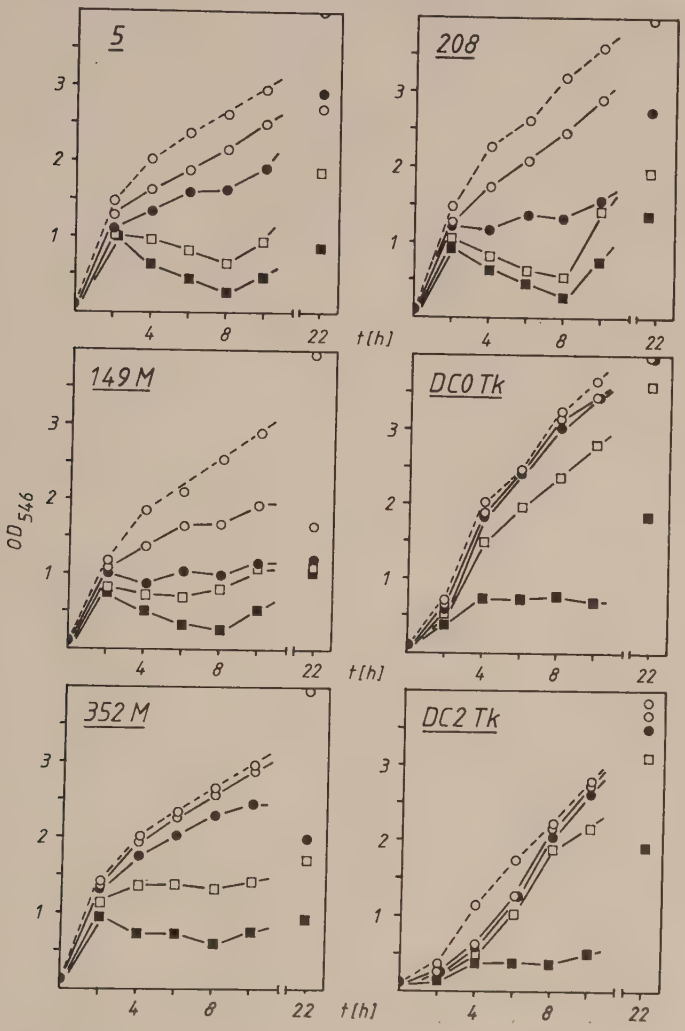


Der Versuch wurde in NI-Standard-Bouillion bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad durchgeführt.

3.3.6. Wachstum in Gegenwart von Azthreonam und Latamoxef

Besonderes Interesse galten dem Monobactam Azthreonam und dem Cephamycin Latamoxef, da beide außerordentlich ß-Laktamase-stabil sein sollten.
Der Einfluß von 8, 16, 32 und 64 µg/ml Azthreonam (Abb. 15) nach Zugabe zu Anfang des Wachstums war schon bei subinhibitorischen Konzentrationen erheblich ausgeprägter, als der von Cefotaxim unter gleichen Bedingungen (siehe 3.3.1.). Im Unterschied zu Cefotaxim wurde das Monobactam während des Wachstums kaum abgebaut, nach 22 h waren noch erhebliche Mengen vorhanden (Tabelle 10).
Auch mit 4, 8, 16 und 32 µg/ml Latamoxef konnte eine intensive Störung des Wachstums beobachtet werden, nach Zugabe bei OD_{546} von 0.01 (Abb. 16). Das Cephamycin wurde aber erheblich besser als Azthreonam abgebaut.

Abb. 15: Einfluß von Azthreonam auf das Wachstum von E. cloacae 5,352M, 149M, 208, E. coli DC0 Tk und DC2 Tk



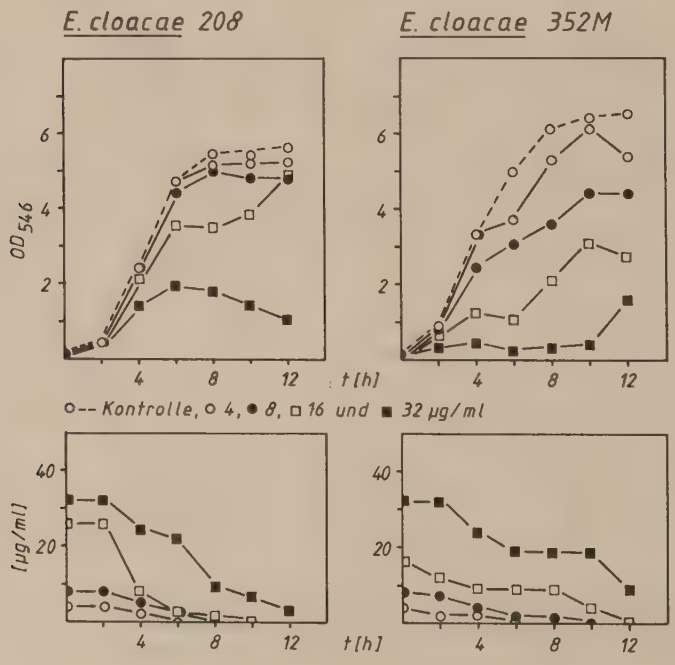
Das Antibiotikum wurde zu Anfang (t_o) zugefügt, Wachstum erfolgte in NI-Standard-Bouillion bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad. Symbole wie Abb. 7 und 8.

Tabelle 10: Azthreonam-Konzentration nach 22 h Inkubation mit E. cloacae 208, 5, 149M, 352M, E. coli DC0 Tk und E. coli DC2 Tk

Konzentration zu Anfang (µg/ml)	E. cloacae und E. coli-Stämme					
	208	DC0 Tk	DC2 Tk	5	149M	352M
64	64	28	10	64	22	64
32	22	20	10	16	22	22
16	8	8	5	10	10	13
8	4	4	3	6	4	6

Alle Konzentrationsangaben in µg/ml

Abb. 16: Einfluß und Abbau von Latamoxef bei E. cloacae



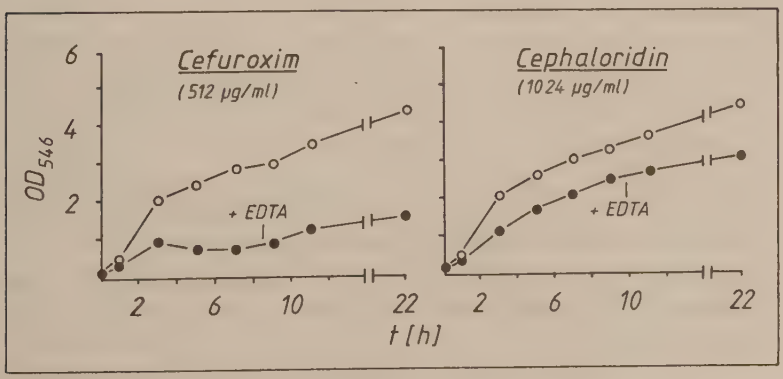
3.3.7. Wachstum und Abbau von Cephalosporinen unter Einfluß von EDTA

EDTA bewirkt aufgrund der Komplexierung von Ca^{++}-Ionen eine Destabilisierung der äußeren Bakterienmembran und erleichtert so einigen Antibiotika die Penetration (Neu und Winshell 1972).

E. cloacae 352M-Kulturen mit einer OD_{546} von 0.01 wurden verschiedene Cephalosporine in An- und Abwesenheit von 1 mM EDTA zugefügt, um so Veränderungen im Abbau der Substanzen und im Verlauf des Wachstums zu untersuchen.
Die verwendeten Konzentrationen entsprachen einer Titerstufe unterhalb der MHK der Cephalosporine, da hier mit dem ausgeprägtesten Einfluß gerechnet werden konnte.

Die geringste Wirkung hatte EDTA auf das Wachstum in Anwesenheit von Cephaloridin, Cefamandol und Ceftizoxim. Aber auch Cephalothin, Ceftriaxon, Cefazolin, Cefoperazon, Cefmenoxim und Cefotiam übten in Verbindung mit EDTA keinen verstärkten Einfluß auf die Wachstumskurve aus. Der Abbau der genannten Substanzen erfolgte in Gegenwart von EDTA nicht signifikant schneller.
Den ausgeprägtesten Einfluß hatte die Zugabe von EDTA bei Wachstum mit Cefuroxim, Cefotaxim und Ceftazidim (Abb. 17).

Abb. 17: Einfluß von Cefuroxim und Cephaloridin in Anwesenheit von 1 mM EDTA auf das Wachstum von E. cloacae 352M



Der Abbau von Cefuroxim erfolgte schneller, bereits nach 8 Stunden konnte im Medium kein Antibiotikum mehr nachgewiesen werden, Cefotaxim und Ceftazidim wurden ebenfalls schneller abgebaut (Tabelle 11).

Tabelle 11: Abbau von Cefuroxim, Ceftazidim und Cefotaxim in Anwesenheit von 1 mM EDTA durch E. cloacae 352 M

Antibiotikum	Anfangs-konzentration	Zeit (h)	End-konzentration
Cefuroxim	512 µg/ml	11	110 µg/ml
" + EDTA	" "	8	0 "
Cefotaxim	128 "	9	4 "
" + EDTA	" "	6	0 "
Ceftazidim	64 "	9	4 "
" + EDTA	" "	3	0 "

3.4. Untersuchungen zum Mechanismus der Resistenz

3.4.1. Einfluß der Enzymaktivität der ß-Laktamase auf Resistenz

Durch die vorangegangenen Wachstumsversuchen war deutlich geworden, daß die Cephalosporinase der jeweiligen E. cloacae-Stämme die sogenannten "Hydrolyse-stabilen" Cephalosporine der dritten Generation zu inaktivieren vermochte. So stellte sich die Frage, ob enzymatische Spaltung und Höhe der Resistenz im Zusammenhang stehen.

Die Enzymaktivität mit Cephalosporinen wurde mit dem photometrischen Test im UV-Spektralphotometer gemessen und die jeweils optimale Wellenlänge durch Differenzspektren ermittelt (Tabelle 12). Bei der Hydrolyse kam es im Bereich von 240 bis 280 nm zu einer deutlichen Abnahme der Extinktion, bei 220 nm entstand bei allen Substanzen ein neuer Peak, der den Spaltprodukten zugeordnet werden konnte (Abb. 18).

Die Hydrolyse von Aminothiazol-Cephalosporinen wurde der größeren Empfindlichkeit wegen mit dem mikrobiologischen Test gemessen.

Für Penicilline konnte (außer für Ampicillin) nicht die

spektrophotometrische Methode angewandt werden, da die Spaltprodukte im Bereich des ß-Laktamrings absorbierten. Hier wurde die sehr empfindliche mikrojodometrische Methode benutzt.

Tabelle 12: Maximale Absorption des ß-Laktamrings von Cephalosporinen und einigen Penicillinen

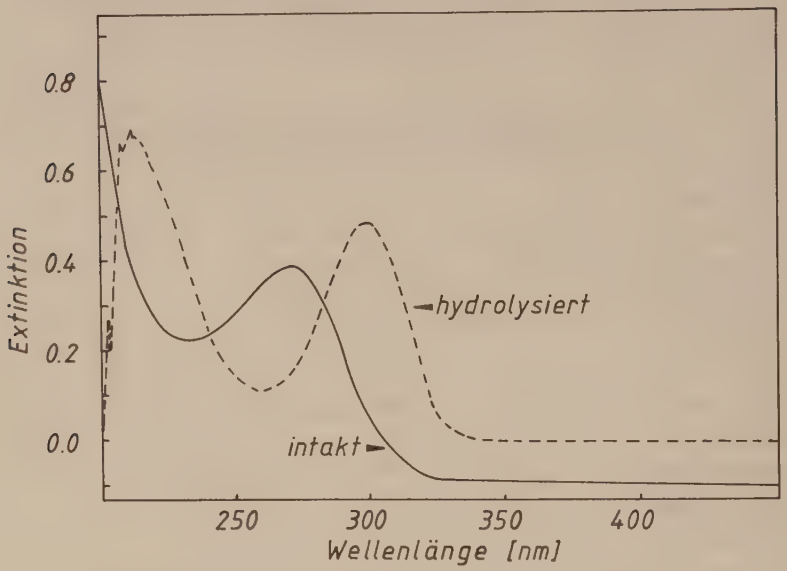
Cephalosporine	Wellenlänge (nm)
Cephaloridin	270
Cephalothin	270
Cefazolin	266
Cephacetril	260
Cefotiam	280
Cefamandol	274
Cefoxitin	270
Cefoperazon	276
Cefotaxim	264
Ceftriaxon	240
Ceftizoxim	250
Cefuroxim	264
Ceftazidim	272
Latamoxef	274
Penicilline	
Penicillin G	240
Ampicillin	235
Azthreonam	250

Bei diesen Wellenlängen wurde der photometrische Enzymtest ausgeführt.

3.4.1.1. Enzymaktivität der Cephalosporinase aus E. cloacae

Mit Rohextrakten verschiedener E. cloacae-Stämme wurde die Enzymaktivität bestimmt, um quantitative Aussagen über den Umfang der Spaltung von Cephalosporinen und Penicillinen machen zu können.

Abb. 18: Differenzspektrum am Beispiel von Cefazolin



Die älteren Cephalosporine Cephaloridin, Cephalothin und Cefazolin wurden gut hydrolysiert. Mit denen der zweiten Generation wiesen die Cephalosporinasen lediglich für Cefotiam vergleichbare Aktivität auf. Die Inaktivierung der modernen Cephalosporine, wie z.B. Ceftazidim verlief deutlich langsamer, die Enzymaktivitäten lagen im Bereich von 3 - 60 mU. Einige Vertreter der Aminothiazolcephalosporine, so Desacetyl-Cefotaxim, HR810, Ceftizoxim und Ceftriaxon wurden, verglichen mit beispielsweise Cefotaxim rascher abgebaut (Tabelle 13).

Die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 fiel unter den verwendeten Enzymen durch besonders gute Hydrolyse der modernen Cephalosporine auf. Bereits nach 40 min waren 640 µg/ml Cefmenoxim abgebaut, Cefotaxim nach etwas mehr als 50 min, Ceftriaxon sogar nach 30 und Ceftizoxim schon nach 10 min (Abb. 19). Die Aktivität mit diesen Substanzen war etwa dreimal höher, als die der anderen ß-Laktamasen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Enzymaktivität der ß-Laktamasen aus E. cloacae 208, 149M, 352M, 5 und P99 mit Cephalosporinen

Cephalosporine	ß-Laktamase aus E. cloacae {U/mg}				
	208	149M	352M	5	P99
Cephaloridin	7.8	6.1	12	2.3	3.7
Cephalothin	35	7.8	10	1.3	2.5
Cefazolin	3.2	3.25	5.3	0.73	0.9
Cefotiam	6.3	0.71	0.7	0.16	0.25
Cefoxitin	0.3	0.05	0.025	0.02	0.009
Cefamandol	1.5	0.19	0.43	0.07	0.09
Cefuroxim	0.02	0.003	0.006	0.003	0.005
Cefoperazon	0.54	0.063	0.06	0.034	0.04
Cefotaxim	0.014	0.004	0.005	0.004	0.005
Desacetyl-CTX	0.27	0.34	0.064	0.035	0.023
HR810	0.07	0.08	0.152	0.05	0.048
BMY28142	0.002	0.003	0.005	0.0016	0.004
Ceftizoxim	0.064	0.026	0.04	0.007	0.021
Ceftriaxon	0.03	0.0042	0.0035	0.002	0.006
Ceftazidim	0.0065	0.0038	0.0035	0.003	0.004
Cefmenoxim	0.012	0.003	0.0027	0.003	0.003
Latamoxef	0.003	0.0039	0.005	0.004	0.003
Cephacetril	5.8	1.5	3.9	1.1	1.2

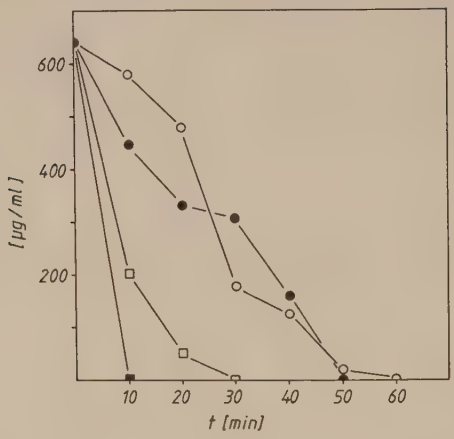
Die Cephalosporine wurden 0.1 mM, bzw. 1 mM (mikrobiologischer Test) im Test vorgegeben, die Enzymaktivität wurde als spezifische Aktivität berechnet {U/mg}.

Die Cephalosporinase aus E. cloacae 5 wies dagegen vor allem mit älteren Cephalosporinen und Penicillinen (Tabelle 13, 15) eine niedrigere Aktivität als die anderen ß-Laktamasen auf.

Ausgesprochen geringe Enzymaktivitäten wurden auch für die Cephalosporinasen aus E. cloacae 159 und 2091 ermittelt (Tabelle 14).

Von den untersuchten Penicillinen (Tabelle 15) wurde Oxacillin, Mecillinam, Temocillin, sowie das Carbapenem und

Abb. 19: Abbau verschiedener Aminothiazolcephalosporine durch die ß-Laktamase aus E. cloacae 208



Cefotaxim (○), Cefmenoxim (●), Ceftriaxon (□), Ceftizoxim (■)
Der Abbau wurde im mikrobiologischen Enzymtest ermittelt und Rohextrakt (2.15 mg/ml Protein) verwendet.

Tabelle 14: Enzymaktivität {U/mg} der ß-Laktamasen aus E. cloacae 159 und 2091 mit Cephalosporinen

Cephalosporine	ß-Laktamase aus E. cloacae	
	159	2091
Cephaloridin	2.5	1.1
Cephalothim	3.6	1.1
Cefotiam	0.22	0.09
Cefamandol	0.06	0.07
Cefotaxim	0.005	0.005
Ceftizoxim	0.012	0.009

Die Enzymaktivität wurde,wie schon unter Tabelle 13 beschrieben, bestimmt.

das Monobactam Azthreonam nur langsam durch die Cephalosporinase der verwendeten E. cloacae-Stämme hydrolysiert.

Tabelle 15: Enzymaktivität der ß-Laktamasen aus E. cloacae 208, 149M, 352M und 5 mit Penicillinen

Penicilline	spez. Aktivität (U/mg) der ß-Laktamase von E. cloacae			
	208	149M	352 M	5
Ampicillin	0.139	0.064	0.048	0.049
Penicillin G	0.99	1.03	1.29	0.45
Mecillinam	0.008	0.016	0.019	0.016
Piperacillin	0.07	0.047	0.068	0.033
Azlocillin	0.099	0.117	0.092	0.045
Mezlocillin	0.089	0.064	0.11	0.083
Oxacillin	0.0038	0.01	0.0078	0.015
N,F-Thienamycin	0.0013	0.0019	0.002	0.0032
Temocillin	0.0034	0.008	0.002	0.0098
Azthreonam	0.002	0.0029	0.004	0.005

Die Enzymaktivität wurde mikrojodometrisch mit 0.2 mM des jeweiligen Penicillins im Testansatz ermittelt, die Aktivität mit N,F-Thienamycin wurde durch die mikrobiologische Methode (0.5 mM im Testansatz) bestimmt.

3.4.1.2. Vergleich von Enzymaktivität und MHK bei Mutanten und Wildtypen von E. cloacae

Die Enzymaktivität der ß-Laktamasen aus den CTX^s-Wildtypen wurde mit der der Mutanten (CTX^r) verglichen und als Substrat 0.1 mM Cephaloridin im Test verwendet (Tabelle 16). Durch die Mutation zur konstitutiven Enzymproduktion konnte in den CTX^r-Mutanten eine zum Teil erhebliche Steigerung der Enzymaktivität gemessen werden. Dies korrelierte weitgehend mit dem Anstieg der Resistenz vor allem gegen dritte Generation Cephalosporine (Tabelle 17).

Tabelle 16: Enzymaktivität der ß-Laktamase aus CTX^s- und CTX^r-Stämmen von E. cloacae

E. cloacae		ß-Laktamase Aktivität {U/mg}	Aktivitätssteigerung
352	W	0.02	
	M	12	600 - fach
149	W	0.035	
	M	6.1	170 "
988	W	0.008	
	M	11	1375 "
150	W	1.25	
	M	5	4 "
314	W	0.8	
	M	3.8	4.75 "

W = Wildtyp (CTX^s), M = Mutante (CTX^r)
Die Bestimmung der spez. Enzymaktivität erfolgte mit 0.1 mM Cephaloridin im Test.

Tabelle 17: Anstieg der MHK verschiedener ß-Laktamantibiotika nach Mutation zur CTX^r-Resistenz

Antibiotikum	E. cloacae				
	352W/M	149W/M	988W/M	150W/M	314W/M
Cephaloridin	4	4	1	2	16
Cefoxitin	8	2	4	2	4
Cefamandol	512	512	8	4	4
Cefotaxim	1024	512	32	16	128
HR810	128	64	128	4	8
Ceftizoxim	512	128	64	4	512
Ceftazidim	512	256	16	2	64
Temocillin	16	8	2	4	4
Ampicillin	128	128	64	n.b.	n.b.

Als Anstieg wurde das Verhältnis der MHK-Werte vor und nach Mutation angegeben.

3.4.1.3. Bestimmung der Menge an ß-Laktamase in E. cloacae

Ein Vergleich des Gesamtproteins von Wildtypen und Mutanten (OD_{546} der Kulturen = 1) machte deutlich, daß in den CTX^r-tatsächlich große Mengen ß-Laktamase gebildet wurden Tabelle 18).

Tabelle 18: Gesamtprotein von E. cloacae 149W/M und 352W/M

E. cloacae	Gesamtprotein (mg/ml)	Differenz
352W	0.653	
352M	0.74	0.087
149W	0.993	
149M	0.976	0.083

Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte mit ganzen Zellen der OD_{546} von eins, die Angaben in der Tabelle waren Mittelwerte aus drei Messungen.

So enthielt Stamm 352M 0.087 mg/ml Protein mehr als Stamm 352W. Der Anteil des Enzyms am Gesamtprotein von 352M betrug demnach 11.8 %. Bei E. cloacae 149M wurde eine Zunahme um 0.083 mg/ml beobachtet. Der Anteil der ß-Laktamase am Gesamtprotein von 149M betrug 8.9 %.

Da für E. cloacae 208, einem klinischen CTX^r-Isolat, kein Vergleich des Gesamtproteins vor und nach Mutation zur konstitutiven Enzymproduktion durchgeführt werden konnte, wurde die Menge an ß-Laktamase anhand der quantitativen Reinigung der Cephalosporinase bestimmt.
In vier Schritten wurde die ß-Laktamase bis zur Homogenität gereinigt (Tabelle 19). Aus 4.5 l Zellen bei OD_{546} von 1 konnten 16.2 mg ß-Laktamase erhalten werden. Unter Berücksichtigung des Verlustes während der Anreicherung wurde errechnet, daß bei 0.73 mg/ml Gesamtprotein 0.01 mg/ml ß-Laktamase gebildet werden. Dies entsprach einem Anteil von 1.4 % ß-Laktamase am Gesamtprotein von 1 ml Zellen.

Auch bei der isoelektrischen Fokussierung von unter gleichen

Bedingungen gewonnenen Rohextrakten wurde bei E. cloacae 352M und 149M eine deutlich intensivere und breitere ß-Laktamase-Bande als bei Stamm 208 gefunden. Dies war ein zusätzlicher Hinweis, daß die beiden Mutanten erheblich größere Mengen ß-Laktamase produzierten.

Tabelle 19: Quantitative Reinigung der ß-Laktamase aus E. cloacae 208

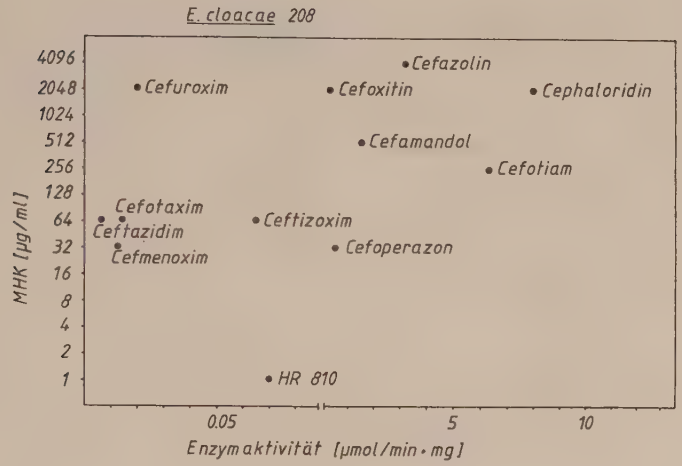
Schritt	spez. Aktiv. {U/mg}	Gesamt-protein {mg}	Gesamt-volumen {ml}	Gesamt-aktiv. {U}	Reinigungs-faktor	Ausbeute %	Verlust %
1	4	3282.2	35	13125	-	100	-
2	13.82	692.2	26	9575.8	3.45	73	27
3	22.82	111.38	37.5	9910.7	5.71	75.5	24.5
4	133.12	35	5	4659.1	33.4	35.5	64.5
5	300.3	16.2	4.45	4795	75	36.5	63.5

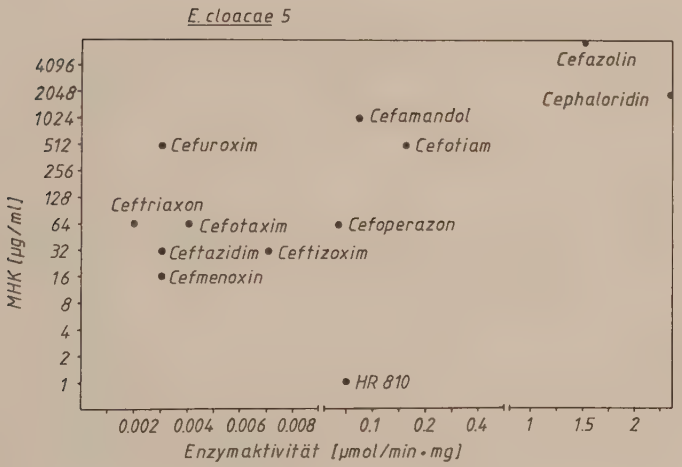
1) Rohextrakt, 2) Ultrazentrifugation, 3) DE 52, 4) S 300, 5) G 75
Die Enzymaktivität wurde mit 0.1 mM Cephaloridin bestimmt

3.4.1.4. Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. cloacae

Da mit Cefotaxim und anderen modernen ß-Laktamantibiotika, wenn auch geringe Enzymaktivität der Cephalosporinase nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit Hydrolyse eines Antibiotikums und Höhe der Resistenz bei E. cloacae korrelieren (Abb. 20).
So war durchaus eine Tendenz zu erkennen, bei vielen Substanzen aber konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen enzymatischer Inaktivierung und MHK-Wert hergestellt werden. Cefuroxim beispielsweise wurde nur langsam hydrolysiert, die MHK lag aber im gleichen Bereich wie die von Cephaloridin, HR810 zeichnete sich durch größere Instabilität aus, dennoch wurde keine Resistenz ausgebildet,und bei den gut abbaubaren Cephalosporinen hätte man höhere MHK-Werte erwartet.

Abb. 20: Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. cloacae 208 und 5

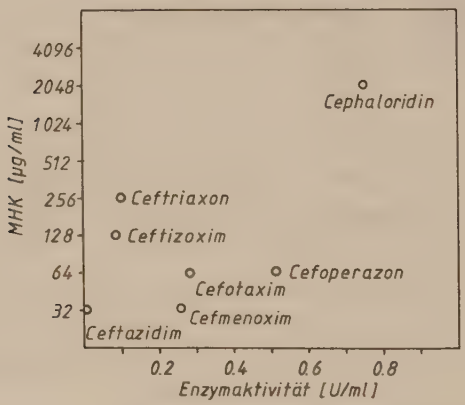




3.4.1.5. Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei P. cepacia 7946

Eine eindeutige Korrelation zwischen Enzymaktivität und Resistenzhöhe war auch bei P. cepacia, der eine ß-Laktamase besaß, welche selbst moderne Cephalosporine mit hoher Aktivität zu inaktivieren vermochte, nicht möglich (Abb. 21).

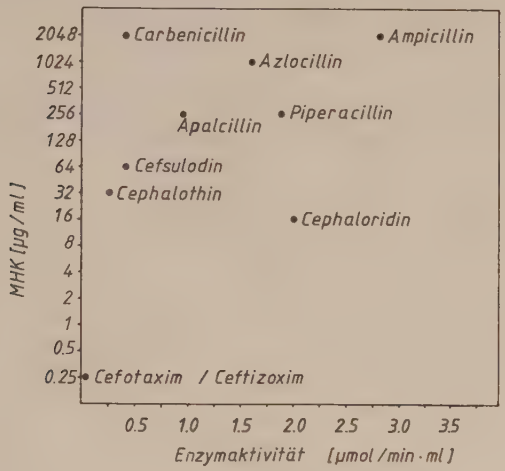
Abb. 21: Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei P. cepacia 7946



3.4.1.6. Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. coli W3110 mit TEM-1

Die Penicillinase TEM-1 vermittelte Resistenz gegen Penicilline und Cephalosporine der ersten Generation, nicht aber gegen Cephalosporine der dritten Generation. Ampicillin (2.75 U/ml) und Cephaloridin (2.0 U/ml) wurden gut hydrolysiert, die Enzymaktivität mit Cefotaxim (0.05 U/ml) war vergleichbar mit der der Cephalosporinasen aus E. cloacae.
Wie schon mit den Enzymen aus E. cloacae und P. cepacia 7946 konnte auch bei der Penicillinase TEM-1 kein ausschließlicher Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Resistenz gefunden werden (Abb. 22).

Abb. 22: Korrelation zwischen Enzymaktivität und MHK bei E. coli W3110 mit TEM-1



3.4.2. Einfluß der Affinität von ß-Laktamantibiotika zur ß-Laktamase auf Resistenz

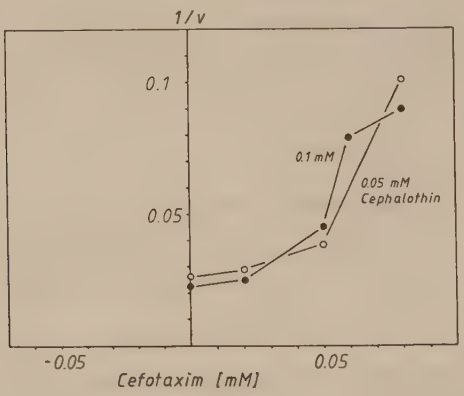
Die Zunahme der Enzymmenge, bzw. Enzymaktivität nach Mutation zur konstitutiven Produktion der ß-Laktamase bei E. cloacae korrelierte weitgehend mit der Erhöhung der Resistenz. Eine allgemeingültige Beziehung zwischen MHK und Enzymaktivität aber konnte nicht erstellt werden, neben der bloßen Inaktivierung eines Antibiotikums spielten offensichtlich noch andere Faktoren eine Rolle. Aus diesem Grund wurde als weiterer Parameter die Affinität der ß-Laktamantibiotika zu den Cephalosporinasen aus E. cloacae untersucht.

3.4.2.1. Affinität von Cephalosporinen und Penicillinen

Als Maß für Affinität einer Substanz wurde nicht der K_i-Wert verwendet, da Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Inhibitor-Konstanten nach Dixon (1953) auftraten (Abb. 23). Stattdessen wurde diejenige Menge eines Antibiotikums, welche die Hydrolyse von 0.06 mM PADAC zu 50% hemmte (I_{50}-

Wert) zugrunde gelegt. Hierbei wurde die Kompetition um die Bindestelle des ß-Laktamrings im aktiven Zentrum der ß-Laktamase bestimmt, je höher die Affinität einer Substanz war, desto weniger wurde benötigt, um die Reaktion um 50% zu hemmen.

Abb. 23: Auftragung nach Dixon zur Bestimmung des K_i-Wertes von HR810 mit der Cephalosporinase aus E. cloacae P99



Da kein linearer Dixon-Plot möglich war konnte der K_i-Wert nicht ermittelt werden.

Die Affinität verschiedener Cephalosporine und Penicilline wurde mit Rohextrakten von E. cloacae 208, 149M, 352M, 5 und P99 bestimmt. Die höchste Affinität zu den Cephalosporinasen wiesen Azthreonam, Latamoxef und die Aminothiazol-Cephalosporine auf (Tabelle 20). Die niedrigste Affinität hatten Cephaloridin und Cefazolin, die Cephalosporine der zweiten Generation, z.B. Cefamandol, hemmten die Hydrolyse von PADAC deutlich besser als beispielsweise Cephaloridin, aber nicht so intensiv wie Cefotaxim oder Cefmenoxim.
Unter den Aminothiazol-Cephalosporinen fielen Ceftazidim, vor allem aber HR810 und BMY28142 durch außerordentlich geringe Affinität zu den Cephalosporinasen auf.
Die untersuchten Penicilline hatten, außer Oxacillin und N,F-Thienamycin, keine sehr hohe Affinität zu den ß-Laktamasen der E. cloacae-Stämme.

Tabelle 20: Affinität von Penicillinen und Cephalosporinen zu den Cephalosporinasen aus E. cloacae 208, 5, 352M, 149M und P99

Antibiotikum	Cephalosporinasen aus E. cloacae 208	P99	352M	5	149M
Cephaloridin	200	160	170	267	200
Cephalothin	46	28	28	33	20
Cefazolin	400	155	300	320	340
Cefotiam	30	12	3.7	13	12
Cefamandol	3	0.6	4.2	1.3	1.2
Cefoxitin	0.35	0.06	0.04	0.12	0.12
Cefuroxim	0.02	0.007	0.012	0.014	0.014
Cefoperazon	15	11.4	0.8	13	12
HR810	40	20	13.7	13	17.4
Desacetyl-CTX	0.33	0.44	0.5	0.9	0.5
Cefotaxim	0.02	0.008	0.01	0.033	0.013
BMY28142	542	52.2	50	37.5	22.9
Ceftizoxim	0.4	0.27	0.15	0.36	0.31
Ceftriaxon	0.075	0.028	0.028	0.033	0.027
Ceftazidim	4.5	2.9	0.85	3.3	3.1
Cefmenoxim	0.026	0.008	0.013	0.03	0.012
Latamoxef	0.017	0.016	0.01	0.03	0.014
Penicillin G	22.5	n.b.	252	100	340
Ampicillin	7.5	n.b.	34.8	7.5	72.7
Oxacillin	0.33	n.b.	44.44	15	80
Mecillinam	43.4	12	43.8	42	50
Piperacillin	32.1	n.b.	34.8	150	24
Azlocillin	7.5	n.b.	26.7	33.3	100
Mezlocillin	72.6	n.b.	36.4	400	400
Temocillin	18	n.b.	7.3	17.1	36.4
N,F-Thienamycin	0.25	0.06	0.061	0.058	0.07
Azthreonam	0.007	0.014	0.008	0.03	0.012

Die Affinität wurde als I_{50} {µg/ml} angegeben, als Substrat fand 0.06 mM PADAC Verwendung

Die I_{50}-Werte waren für Cefotaxim und HR810 höher, wenn anstelle von PADAC 0.1 mM Cephalothin verwendet wurde, dies zeigte, daß die Affinitätsbestimmung relativ zum verwendeten Substrat war (Tabelle 21).

Tabelle 21: I_{50}-Werte {µg/ml} von Cefotaxim und HR810 bei Verwendung von 0.1 mM Cephalothin als Substrat

ß-Laktamase aus E. cloacae	Cefotaxim	HR810
P99	0.053	20
208	0.024	25
352M	0.115	32.5
149M	0.091	30

Verglichen mit der Affinität zweier typischer ß-Laktamase-Inhibitoren, Clavulansäure und Sulbactam, wies Cefotaxim eine sehr niedrige Affinität zu der Penicillinase TEM-1 auf (Tabelle 22).

Tabelle 22: I_{50}-Werte {µM} von Cefotaxim, Clavulansäure und Sulbactam bei der Penicillinase TEM-1

Antibiotikum	I_{50}-Wert {µM}
Cefotaxim	85
Clavulansäure	10
Sulbactam	9

Als Substrat wurde 1 mM Ampicillin verwendet.

Bei den Cephalosporinasen aus E. cloacae bestand offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität mit den verwendeten Cephalosporinen und deren Affinität zur Laktamase (Tabelle 23). Die gut hydrolysierbaren Substanzen hatten meist eine geringere Affinität zur Cephalosporinase, während die Antibiotika mit hoher Affinität nur langsam inaktiviert werden konnten.

Tabelle 23: Korrelation zwischen Enzymaktivität und Affinität bei einigen Cephalosporinen am Beispiel von ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 352M

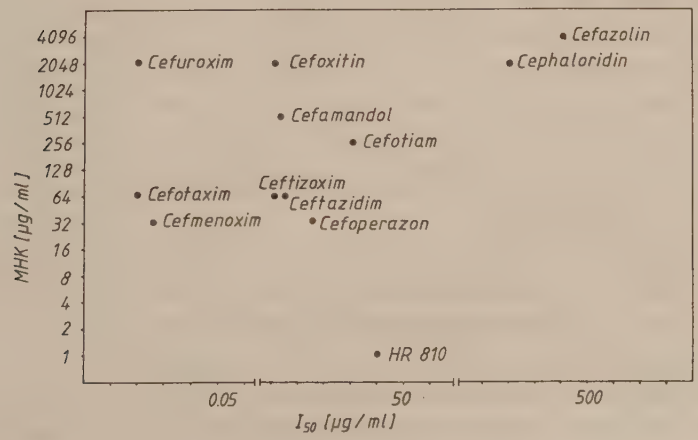
Antibiotikum	ß-Laktamase aus 208 Affinität	Aktivität	ß-Laktamase aus 352M Affinität	Aktivität
Cephaloridin	200	7.8	170	12
Cefamandol	3	1.5	4.2	0.43
Cefotaxim	0.02	0.014	0.01	0.005
Desacetyl-CTX	0.33	0.27	0.5	0.064

Affinität (I_{50} {µg/ml}), Aktivität (U/mg)

3.4.2.2. Korrelation zwischen Affinität zur ß-Laktamase und MHK bei E. cloacae

Die modernen Cephalosporine wiesen ausgeprägte Affinität zu den ß-Laktamasen der jeweiligen E. cloacae-Stämme auf. So stellte sich die Frage, ob vielleicht ein Zusammenhang zwischen Enzymaffinität und Höhe der Resistenz bestand (Abb. 24).

Abb. 24: Korrelation zwischen Affinität zur ß-Laktamase aus E. cloacae 208 und MHK der ß-Laktamantibiotika



Aber wie schon beim Vergleich von Enzymaktivität und MHK konnte keine eindeutige Abhängigkeit für alle verwendeten ß-Laktamantibiotika gefunden werden. Eine Tendenz war zu erkennen, aber auch hier wurde offensichtlich, daß nicht nur ein Faktor für die Höhe der MHK, bzw. Resistenz verantwortlich sein konnte.

3.4.2.3. Affinität der ß-Laktamantibiotika zu den PBP's

Die Affinität der untersuchten Cephalosporine und Penicilline zu den PBP's wurde indirekt über die MHK der Penetrationsmutante E. coli DC2 ermittelt (Tabelle 7). Dabei wurde vorausgesetzt, daß Stamm DC2 aufgrund seiner defekten äußeren Membran nur in Gegenwart von Konzentrationen wachsen konnte, die unter der Empfindlichkeit der relevanten PBP's lagen.
Daß die MHK-Werte mit E. coli DC2 tatsächlich die Affinität zu den PBP's widerspiegelten, konnte von Curtis et al. (1979) durch direkte Bindestudien mit den PBP's von E. coli DC0 gezeigt werden.

3.4.3. Einfluß der Penetration von ß-Laktamantibiotika durch die äußere Bakterienmembran auf Resistenz

Die Wirksamkeit von ß-Laktamantibiotika hängt nicht zuletzt von ihrer Fähigkeit ab, die äußere Bakterienmembran mehr oder weniger schnell zu passieren. Neben der Aktivität der Cephalosporinasen aus E. cloacae und der Affinität von ß-Laktamantibiotika zu diesen ß-Laktamasen wurde deshalb als weiterer Parameter die Penetration von verschiedenen Cephalosporinen und Penicillinen untersucht.

3.4.3.1. Berechnung des Penetrationsfaktors mit E. coli DC0 und DC2

Die MHK-Werte mit E. coli DC0 (intakte äußere Membran) und DC2 (defekte äußere Membran) wurden als Maß für Penetrationsfähigkeit von Cephalosporinen und Penicillinen verwendet (Tabelle 24).
Die äußere Bakterienmembran erwies sich vor allem für Penicilline, besonders Acylureidopenicilline, aber auch

für Cephalosporine, wie Cefamandol oder Cefuroxim, als Penetrationshindernis. Wohingegen Moleküle mit einer zusätzlichen positiven Ladung wie Cephaloridin, HR810, Ceftazidim und BMY28142 vergleichsweise besser penetrierten.

Nach Erwerb des Resistenzplasmids pBP100, das die Cephalosporinase aus E. cloacae 208 codierte, war der Penetrationsfaktor für fast alle der getesteten Antibiotika 2.

Tabelle 24: Penetrationsfaktor mit E. coli DC0 und DC2 für einige Cephalosporine und Penicilline

Antibiotikum	E. coli DC0/DC2	E. coli DC0 Tk/DC2 Tk
Cephaloridin	1	4
Cefotiam	1	2
Cefamandol	16	2
Cefuroxim	32	1
Cefotaxim	8	2
HR810	2	2
BMY28142	4	2
Ceftazidim	2	2
Cefmenoxim	16	2
Penicillin G	32	n.b.
Azlocillin	128	2
Mezlocillin	80	2
Oxacillin	256	2
Temocillin	2	2
N,F-Thienamycin	2	1

Die Penetrationsfaktoren für die in dieser Tabelle nicht aufgeführten ß-Laktamantibiotika sind den MHK-Werten für E. coli DC0 und DC2 in Tabelle 7 zu entnehmen.

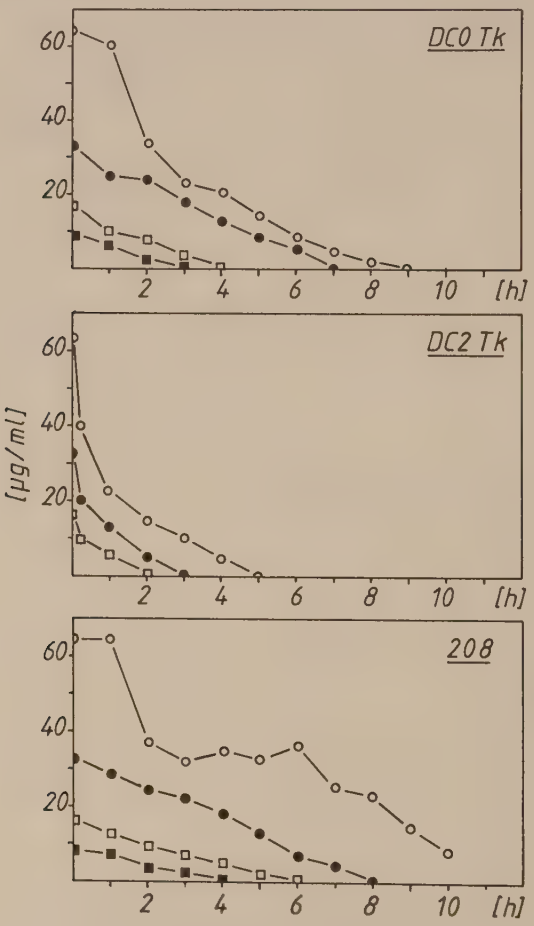
3.4.3.2. Vergleich des Abbaus von Cefotaxim bei E. coli DC0 Tk und DC2 Tk, sowie E. cloacae 208

Kulturen von E. coli DC0 Tk und DC2 Tk, sowie E. cloacae 208 wurden bei einer OD_{546} von eins 8, 16, 32 und 64 µg/ml Cefotaxim zugefügt und die Abnahme von Cefotaxim im Verlauf der

Inkubation bei 37°C bestimmt, die Zellzahl wurde während des Versuchs konstant gehalten.

E. coli DC2 Tk baute Cefotaxim zweimal schneller ab, als E. coli DC0 Tk (Abb. 25).

Abb. 25: Abbau von Cefotaxim bei E. coli DC0 Tk, DC2 Tk und E. cloacae 208



(■) 8 µg/ml, (□) 16 µg/ml, (●) 32 µg/ml, (○) 64 µg/ml
Die optische Dichte wurde für die Dauer des Versuchs konstant (eins) gehalten.

Bei der Konzentrationsbestimmung direkt nach Zugabe von 64 µg/ml Cefotaxim konnten bei DC2 Tk nur noch 39 µg/ml, nach Zugabe von 32 µg/ml noch 20 µg/ml und nach Zugabe von 16 µg/ml nur noch 9.5 µg/ml Cefotaxim nachgewiesen werden, 8 µg/ml Cefotaxim wurden sofort vollständig von den Zellen aufgenommen.
Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Proben von E. coli DC0 Tk und DC2 Tk mit 64 µg/ml Cefotaxim Anfangskonzentration bestätigte den Befund. Bei DC2 Tk trat bereits nach 1 h deutlich das Spaltprodukt von Cefotaxim auf (R_F von 0.66), bei DC0 Tk hingegen verschwand der Cefotaxim-Fleck (R_F-Wert von 0.33) erst nach 5 Stunden, ein Produktfleck trat nicht auf.
Die E. cloacae-Kulturen bauten Cefotaxim langsamer ab, als E. coli DC0 Tk.

3.4.3.3. Kryptizität der ß-Laktamase

Die Verborgenheit (Kryptizität) der ß-Laktamase ist ein weiteres Maß für die Penetrationsfähigkeit eines ß-Laktamantibiotikums. Die Enzymaktivität der Cephalosporinasen aus E. cloacae 208, 5, 352M, 149M, E. coli DC0 Tk und DC2 Tk wurde mit ganzen Zellen (V_{intact}) und mit aufgeschlossenen Zellen ($V_{sonicated}$) bestimmt.

Mit Cefotaxim und Azthreonam

Die Kryptizität der ß-Laktamasen war Konzentrations-abhängig, je höher die Cefotaxim-Konzentration im Medium, desto höher auch die Enzymaktivität ganzer Zellen (Abb. 26). Von den untersuchten Stämmen wies E. cloacae 208 die geringste und E. cloacae 352M die höchste Kryptizität der ß-Laktamase auf (Tabelle 25 und 26)
Zwischen E. coli DC0 Tk und der Penetrationsmutanten DC2 Tk konnte ein Unterschied in der Kryptizität von zwei mit Cefotaxim gemessen werden (Tabelle 25).
Azthreonam penetrierte besonders schlecht durch die äußere Membran (Tabelle 27). Auch hier war bei E. cloacae 352M der Faktor wieder am höchsten, zwischen E. coli DC0 Tk und DC2 Tk betrug der Unterschied zwei.

Tabelle 25: Kryptizität der *E. cloacae*-ß-Laktamase A aus *E. cloacae* 208, *E. coli* DC0 Tk und *E. coli* DC2 Tk mit Cefotaxim

Konzentration im Medium {µg/ml}	*E. cloacae*-ß-Laktamase A aus *E. cloacae* 208			*E. cloacae*-ß-Laktamase A aus *E. coli* DC0 Tk			*E. cloacae*-ß-Laktamase A aus *E. coli* DC2 Tk		
	V_s {µg/min x ml}	V_i	V_s/V_i	V_s {µg/min x ml}	V_i	V_s/V_i	V_s {µg/min x ml}	V_i	V_s/V_i
128	2.37	0.36	6.58	2.37	0.7	3.4	2.37	0.91	2.6
64	1.94	0.11	17.64	1.94	0.48	4	1.94	0.64	3
32	1.34	0.073	18.36	1.34	0.19	7.2	1.34	0.34	4
16	1.34	0.048	28	1.34	0.12	11.2	1.34	0.17	8
8	0.88	0.028	31.43	0.88	0.06	14.7	0.88	0.12	7.4

$V_s = V_{sonicated}$

$V_i = V_{intact}$

Die Enzymaktivität mit vollständig aufgeschlossenen Zellen wurde nur für *E. cloacae* 208 bestimmt, wie frühere Untersuchungen gezeigt hatten, war die Aktivität mit *E. coli*-DC0Tk und DC2 Tk-Rohextrakten gleich der von *E. cloacae* 208-Rohextrakt.

Tabelle 26: Kryptizität der ß-Laktamasen aus E. cloacae 352M, 149M und 5 mit Cefotaxim

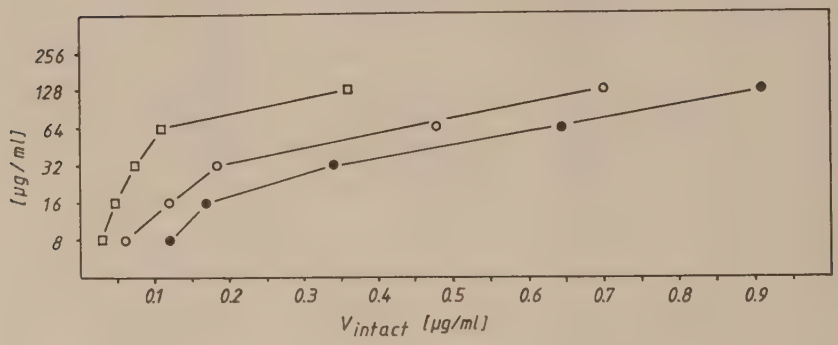
Konzentration im Medium {µg/ml}	E. cloacae 352M		E. cloacae 149M		E. cloacae 5	
	V_{intact} {µg/min x ml}	V_s/V_i	V_{intact} {µg/min x ml}	V_s/V_i	V_{intact} {µg/min x ml}	V_s/V_i
256	0.262	3.6	-	-	-	-
128	0.094	9.3	0.272	2.9	0.252	1.63
64	0.04	21.75	0.112	7.1	0.055	7.45
32	0.015	58	0.044	18	0.026	15.8
16	0.0095	91.6	0.02	39.7	0.012	34.2
8	0.0075	116	0.013	61.1	0.0078	52.6

$V_s = V_{sonicated}$
$V_i = V_{intact}$

$V_{sonicated}$ war bei allen verwendeten Konzentrationen, im Gegensatz zu E. cloacae 208-Rohextrakten, gleich und wurde deshalb nicht mit aufgeführt.

Die Aktivität vollständig aufgeschlossener Zellen von E. cloacae 352M war 0.87 µg/ml x min, von E. cloacae 149M 0.794 µg/min x ml und von E. cloacae 5 0.41 µg/min x ml.

Abb. 26: Kryptizität der E. cloacae-ß-Laktamase-A aus E. cloacae 208, E. coli DC0 Tk und DC2 Tk mit verschiedenen Cefotaxim-Konzentrationen



E. cloacae 208 (□), E. coli DC0 Tk (○), E. coli DC2 Tk (●)

Tabelle 27: Kryptizität der ß-Laktamasen aus E. cloacae 208, 352M, 149M, 5, E. coli DC0 Tk und DC2 Tk mit 32 µg/ml Azthreonam

ß-Laktamase aus	$V_{sonicated}$ {µg/min x ml}	V_{intact}	V_s/V_i
E. cloacae 208	0.31	0.008	38.75
" 352M	0.44	0.0053	83
" 149M	0.44	0.015	21.3
" 5	0.33	0.029	11.72
E. coli DC0 Tk	0.31	0.01	31
" DC2 Tk	0.31	0.023	13.48

Enzymaktivitäten ganzer und aufgeschlossener Zellen wurden im mikrobiologischen Test bestimmt.

Mit Cephaloridin, Cephalothin, Cefamandol und Cefotiam

Diese Kryptizitätsmessungen wurden nur für die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 durchgeführt.
Die Cephalosporine Cephaloridin, Cephalothin und Cefotiam passierten die äußere Bakterienmembran sehr gut (Tabelle 28), mit Cephaloridin lag die Kryptizität der ß-Laktamase auch bei den niedrigsten Konzentrationen um eins, mit Cephalothin und Cefotiam nahm die Kryptizität bei geringeren äußeren Konzentrationen kaum zu. Bei allen drei Substanzen war V_{intact} ab 500 µM im Medium höher als $V_{sonicated}$, bei Messungen mit aufgeschlossenen Zellen konnte bei Substratkonzentrationen über 200 µM Substrathemmung beobachtet werden.
Cefamandol penetrierte deutlich schlechter als die drei anderen Cephalosporine (Tabelle 28). Die Kryptizität der ß-Laktamase war sehr viel höher und zeigte zudem starke Konzentrationsabhängigkeit.

3.4.3.4. Aufnahme von C^{14}-markiertem Cefotaxim

Die Messung der Aufnahme von 64 und 32 µg/ml Cefotaxim bei E. coli DC0 und DC2 (ohne ß-Laktamase) wurde mit Hilfe von C^{14}-markiertem Cefotaxim durchgeführt. Zum Vergleich erfolgte auch eine Bestimmung der Aufnahme von radioaktivem Cefotaxim mit E. coli DC0 Tk und DC2 Tk.
Die Kulturen hatten während des Versuchs eine optische Dichte von eins, die Inkubation fand bei Zimmertemperatur statt. Nach 30 min konnte in Anwesenheit von Cefotaxim bei E. coli DC0 und DC2 Lysis beobachtet werden. Die Aufnahmerate bezog sich deshalb nur auf die ersten 15 min nach Zugabe von Cefotaxim.Bei E. coli DC0 Tk und DC2 Tk wurden ebenfalls nur die ersten 15 min für die Berechnung verwendet, danach trat eine Stagnation in der Aufnahme ein, d.h. wahrscheinlich penetrierte das gleichfalls radioaktive Spaltprodukt von Cefotaxim wieder ins umgebende Medium und so kam es zu einem Gleichgewicht und keiner weiteren Anhäufung von Radioaktivität in den Zellen.

Tabelle 28: Kryptizität der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 mit Cephaloridin, Cephalothin, Cefamandol und Cefotiam

Konzentration {µM}	Cephaloridin			Cephalothin			Cefotiam			Cefamandol		
	V_i	V_s	V_s/V_i	V_i	V_s	V_s/V_i	V_i	V_s	V_s/V_i	V_i	V_s	V_s/V_i
	{µmol/min•ml}			{µmol/min•ml}			{µmol/min•ml}			{µmol/min•ml}		
4000	-	-	-	-	-	-	17.5	-	-	0.56	-	-
2000	17.8	-	-	-	-	-	8.2	-	-	-	-	-
1000	8.1	-	-	-	-	-	4.2	-	-	-	-	-
500	3.9	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-
200	1.7	2.0	1.17	8.6	9.7	1	1.3	1.57	1.2	0.043	0.42	10
100	2.4	2.57	1.05	4.7	9.7	2	0.9	1.76	1.95	0.007	0.42	61.5
50	1.22	1.28	1.05	2.5	6.2	2.5	0.65	0.99	1.52	0.005	0.37	70
20	0.62	0.57	0.92	1.02	3.6	3.5	0.26	0.87	3.4	0.003	0.3	111

Die Werte für DC0 Tk und DC2 Tk korrelierten mit den enzymatisch ermittelten (siehe S. 80), von den Stämmen ohne ß-Laktamase wurden pro Minute zehnmal weniger Cefotaxim aufgenommen als bei DC0 Tk und DC2 Tk mit der E. cloacae-ß-Laktamase A. E. coli DC2 nahm bei Anwesenheit von 64 µg/ml zweimal soviel Cefotaxim auf, wie DC0, bei 32 µg/ml waren es 1.5 mal mehr. Offensichtlich kam der Penetrationsfaktor von 8 nur bei niedrigen äußeren Cefotaxim-Konzentrationen zum Tragen (Tabelle 29).

Tabelle 29: Aufnahme von C^{14}-markiertem Cefotaxim durch E. coli DC0, DC2, DC0 Tk und DC2 Tk

E. coli	Aufnahme {µg/min x ml} von Cefotaxim bei {µg/ml} 64	32
DC0	0.019	0.019
DC2	0.041	0.029
DC0 Tk	0.35	-
DC2 Tk	0.38	-

3.4.3.5. Bestimmung der Konzentration von ß-Laktamantibiotika im periplasmatischen Raum

Zur Berechnung der Konzentration an freiem Antibiotikum im periplasmatischen Raum (s_p) fand die Formel von Zimmermann und Rosselet (1977) Verwendung. So hängt s_p zum einen von der Menge an Antibiotika-Molekülen ab, die durch die äußere Membran eindringen können, zum anderen von der Affinität des jeweiligen Antibiotikums zur ß-Laktamase und schließlich auch von der maximalen Enzymaktivität der ß-Laktamase.

Von Cefotaxim und Azthreonam

Die freie Cefotaximkonzentration in den Zellen lag weit unter der des umgebenden Mediums (Tabelle 30). Sie stieg in Abhängigkeit von der äußeren Konzentration an, bei E. coli DC2 Tk war s_p doppelt so hoch, wie bei E. coli DC0 Tk und viermal so hoch wie bei E. cloacae 208, E. cloacae

5 wies die höchste, E. cloacae 352M die niedrigste Cefotaxim-Konzentration im periplasmatischen Raum auf.

Tabelle 30: Konzentration an freiem Cefotaxim im periplasmatischen Raum von E. cloacae 208, 352M, 149M, 5 E. coli DC0 Tk und DC2 Tk

Konzentration im Medium {µg/ml}	s_p {ng/ml} von Cefotaxim bei E. cloacae 325M	149M	5	208	E. coli DC0 Tk	DC2 Tk
256	3.7	-	-	-	-	-
128	1.2	6.8	49	3.6	7.7	11
64	0.46	2.1	4.9	0.92	4.4	6.8
32	0.17	0.76	2.2	0.6	1.6	3.1
16	0.11	0.33	0.97	0.39	1	1.4
8	0.084	0.19	0.62	0.23	0.5	1

s_p = periplasmatische Konzentration
Als Maß für die Affinität wurden die I_{50}-Werte (Tabelle 20) verwendet, V_{intact} wurde Tabelle 25 und 26 entnommen, die maximale Enzymaktivität der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M betrug mit Cefotaxim 0.9 µg/min x ml, aus E. cloacae 149M 0.8 µg/min x ml, aus E. cloacae 5 0.42 µg/min x ml und aus E. cloacae 208, ebenso wie für E. coli DC0 Tk und DC2 Tk 2.5 µg/min x ml.

Da ein Molekül ß-Laktamase mit einem Molekül Cefotaxim reagiert , unter Vorausetzung einer Bindestelle im aktiven Zentrum der Cephalosporinase, konnte die im periplasmatischen Raum vorhandene ß-Laktamase eine bestimmte Menge Cefotaxim binden. Am Beispiel von E.cloacae 352M, 149M und 208 wurde die Menge Cefotaxim, die bei verschiedenen äußeren Konzentrationen pro Minute hydrolysiert wurde, der Menge Cefotaxim gegenübergestellt, welche von der jeweiligen ß-Laktamase gebunden werden konnte (Tabelle 31).
Interessanterweise lag die MHK von Cefotaxim bei E. cloacae 208 in dem Bereich, wo die abgebaute Cefotaxim-Konzentration pro Minute der Bindekapazität der ß-Laktamase entsprach.

Bei E. cloacae 352M und 149M dagegen war die Kapazität weit größer als die eindringende Menge Cefotaxim, hier war jedoch die Enzymaktivität der ß-Laktamase sehr viel niedriger.

Tabelle 31: Vergleich der Cefotaxim-Konzentration die pro Minute von ganzen Zellen abgebaut und der, die von der ß-Laktamase gebunden werden kann

äußere Konzentration {µg/ml}	E. cloacae 208	E. cloacae 352M	E. cloacae 149M
	µg/ml x 10^{-10} pro Bakterienzelle / min		
256	-	4.2	-
128	5.76	1.63	4.15
64	1.76	0.69	1.7
32	1.17	0.26	0.66
16	0.77	0.16	0.3
8	0.45	0.13	0.19
gebundenes Cefotaxim {µg x 10^{-10}/ml} pro Zelle	2.24	18.4	15.4

Maximale Enzymaktivität mit Cefotaxim der ß-Laktamase bezogen auf eine Bakterienzelle von E. cloacae 208 40 x 10^{-10} µg/min x ml, von E. cloacae 352M 15.6 x 10^{-10} µg/min x ml, von E. cloacae 149M 12.1 x 10^{-10} µg/min x ml.

Mit Azthreonam waren die Verhältnisse ähnlich denen bei Cefotaxim. Die periplasmatische Konzentration war äußerst gering, bei E. cloacae 5 war sie höher als bei allen anderen Stämmen und bei E. cloacae 352M am niedrigsten, zwischen E. coli DC0 Tk und DC2 Tk trat ein Unterschied von zwei auf (Tabelle 32). Hiermit zeigte sich deutlich, wie schon bei den Wachstumsversuchen und der Kryptizitätsmessung, daß Azthreonam schlecht durch die äußere Bakterienmembran penetrierte.

Tabelle 32: Konzentration im periplasmatischen Raum bei 32 µg/ml Azthreonam im Medium

	E. cloacae				E. coli	
	352M	149M	5	208	DC0 Tk	DC2 Tk
s_p {ng/ml}	0.1	0.57	2.7	0.19	0.23	0.56

V_{max} mit ß-Laktamase aus E. cloacae 5 entsprach 0.35 µg/min x ml, aus 352M 0.44 µg/min x ml, aus 149M 0.33 µg/min x ml und aus 208, wie den Transkonjuganten, 0.31 µg/min x ml.

Von Cephaloridin, Cephalothin, Cefotiam und Cefamandol

Diese Bestimmungen wurden nur mit E. cloacae 208 durchgeführt (Tabelle 33).
Die Konzentration an freiem Cefamandol war signifikant niedriger als die der drei anderen Cephalosporine. Bei 100 µM Cephalothin im Medium konnten, berechnete man die Werte von 0.01 ml Bakteriensuspension auf 1 ml, für innere und äußere Konzentration etwa die gleichen Werte ermittelt werden, bei 200 µM Cephalothin, und bei Cephaloridin schon ab 20 µM, wurden für die innere Konzentration höhere Werte errechnet, wenn die Daten auf einem ml Bakteriensuspension bezogen wurden.
Natürlich war die Konzentrationen in den Zellen nicht höher als die im Medium vorhandene, aber diese Berechnungen zeigten, wie rasch die Cephalosporine Cephaloridin und Cephalothin aufgenommen werden konnten.

Bestimmung des Penetrationsparameters C

Der Penetrationsparameter C (Zimmermann und Rosselet 1977) ist ein Maß für die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran (Tabelle 34). Bei z.B. Cefotaxim zeigte sich, je kleiner der Wert für C, desto größer war der Widerstand der äußeren Membran. Auch hier wurde wieder offensichtlich, das E. cloacae 352M eine besonders undurchlässige äußere Membran hatte.
Der Penetrationsparameter C wurde kaum durch die äußere Konzentration beeinflußt, lediglich bei E. coli DC2 Tk konnte eine Erhöhung von C bei geringen Konzentrationen beobachtet werden.

Tabelle 33: Konzentration an Cephaloridin, Cephalothin, Cefotiam und Cefamandol im periplasmatischen Raum von E. cloacae 208

äußere Konzentration {µM}	s_p {µg/ml} von Cephaloridin		Cephalothin		Cefotiam		Cefamandol	
	bezogen auf ml Bakteriensuspension							
	1	0.02	1	0.01	1	0.04	1	0.5
200 (~128 µg/ml)	3424	68.5	371	3.7	71	2.8	0.35	0.17
1oo (~ 64 µg/ml)	391	7.8	34	0.44	29	1.2	0.05	0.023
50 (~ 32 µg/ml)	178	3.5	16	0.16	16	0.66	0.04	0.02
20 (~ 16 µg/ml)	63	1.25	5.4	0.05	5	0.2	0.02	0.009

V_{max} der ß-Laktamase war mit Cephaloridin 1080 µg/min x ml, mit Cephalothin 4050 µg/min x ml, mit Cefotiam 1100 µg/min x ml, und mit Cefamandol 215 µg/min x ml.
Die Meßungen wurden mit Bakterienkulturen der OD_{546} gleich eins durchgeführt.

Tabelle 34: Penetrationsparameter C mit Cefotaxim bei E. coli- und E. cloacae-Stämmen

Konzentration im Medium {µg/ml}	C {min^{-1} x 10^{-3}} von Cefotaxim bei					
	E. cloacae				E. coli	
	352M	149M	5	208	DC0 Tk	DC2 Tk
256	0.94	-	-	-	-	-
128	0.74	2.1	1.9	2.8	5.4	6.9
64	0.62	1.7	0.84	1.7	7	9.9
32	0.47	1.4	0.82	2.3	5.8	10.4
16	0.61	1.2	0.75	2.9	7.4	10
8	0.93	1.4	0.96	3.5	7	15

3.4.4. Zusammenwirken von Enzymaktivität, Affinität zur ß-Laktamase und Penetration bei Resistenz

Die Untersuchung und Bestimmung der verschiedenen Parameter, die für Resistenz gegen ß-Laktamamtibiotika verantwortlich sein konnten, zeigte deutlich, daß ß-Laktamase-Aktivität, ß-Laktamase-Affinität und Permeabilität der Membran für sich allein betrachtet nicht hinreichend die Höhe der Resistenz erklärten. Deshalb wurden die einzelnen Parameter in folgender Formel zusammengefaßt:

$$MHK \triangleq \frac{V_{max} \times P \times A_{PBP} \times t_g}{A_L}$$

Hierbei war V_{max} die Enzymaktivität der ß-Laktamase mit dem jeweiligen Antibiotikum (Tabelle 13 und 15), P der Penetrationsfaktor ermittelt durch die MHK von E. coli DC0/DC2 (Tabelle 24), A_{PBP} die Affinität zu den PBP's bestimmt durch die MHK von E. coli DC2 (Tabelle 7), t_g die Zeit in der bei der angegebenen Enzymaktivität die gesamte eingesetzte Antibiotikum-Konzentration abgebaut wurde und A_L die Affinität eines Antibiotikums zur ß-Laktamase (Tabelle 20).
Die Enzymaktivität wurde umgerechnet auf µg/min x ml und bezogen auf einen ml Bakteriensuspension mit OD_{546} gleich eins (Tabelle 35).

Bei Gegenüberstellung der errechneten Werte mit den MHK-Werten fand sich vor allem bei den modernen Cephalosporinen eine gute Korrelation (Tabelle 36 und 37).
Die rechnerisch ermittelten Werte für Cephaloridin, Cefotiam und Cefazolin waren zu niedrig, die für Cefuroxim und Oxacillin zu hoch. Berechnete man die Werte für Cefuroxim und Oxacillin unter Vernachlässigung von t_g so korrelierten sie recht gut mit den gemessenen MHK-Werten. Da beide Substanzen sehr schlecht durch die äußere Membran penetrierten, spielte der Zeitraum der enzymatischen Inaktivierung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Die zu geringen Werte waren möglicherweise auf zu niedrige V_{max}-Werte zurückzuführen.
Die Unterschiede bei den Penicillinen bei E. cloacae 208 und den Transkonjuganten lagen eventuell an der Penicillinase TEM-2 in den E. coli-Stämmen.

Tabelle 35: Proteingehalt der Rohextrakte und OD_{546} der verwendeten Kulturen

Bei Bestimmung der Aktivität mit Cephalosporinen

E. cloacae	OD_{546}	Protein {mg/ml}
208	0.77	2.15
149M	0.6	2.4
352M	0.704	2.25
5	1.04	2.2
P99	0.83	1.9

Bei Bestimmung der Aktivität mit Penicillinen

E. cloacae	OD_{546}	Protein {mg/ml}
208	1.03	3.56
149M	0.96	2.4
352M	1.03	2.57
5	0.99	1.4

Diese Daten wurden verwendet, um die spez. Aktivitäten der ß-Laktamasen aus den E. cloacae-Stämmen (für den Vergleich von errechneten Werten und MHK-Werten) auf µg/min x ml Bakteriensuspension von OD_{546} gleich eins umzurechnen.

Tabelle 36: Gegenüberstellung der errechneten Werte und der MHK-Werte von Cephalosporinen

	E. cloacae						E. coli			
	5		149M		352M		208		DC0 Tk	DC2 Tk
Cephalosporine	MHK_e	MHK_g	MHK_e	MHK_g	MHK_e	MHK	MHK_e	MHK_g	MHK_g	MHK_g
Cephaloridin	15.4	2048	21	2048	24	2048	10.3	1024	512	128
Cephalothin	7941	16384	13107	16384	4680	8192	2849	8192	2048	1024
Cefazolin	51	8192	24	4096	27	4096	10.1	2048	2048	1024
Cefotiam	0.25	512	0.6	1024	2	1024	0.06	256	512	256
Cefoxitin*	213	256	854	1024	128	512	583	1024	2048	1024
Cefamandol	760	1024	1640	2048	235	1024	170	512	1024	512
Cefuroxim	817	512	1531	512	283	1024	500	2048	2048	2048
Cefoperazon	0.3	64	0.6	128	9	128	0.13	32	128	64
Cefotaxim	110	64	554	128	1430	256	178	64	128	64
Desacetyl-CTX	274	1024	491	1024	968	2048	373	512	2048	1024
HR810	0.002	1	0.0035	2	0.07	4	0.001	1	8	4
Ceftizoxim	5.6	32	12.4	64	52	128	4.6	64	128	64
Ceftriaxon	240	64	1136	256	1097	256	102	64	256	128
Ceftazidim	1.4	32	2.5	64	18	128	1.6	64	256	128
Cefmenoxim	30	16	149	32	279	64	69	32	64	32
Latamoxef	133	16	240	64	82	32	470	32	32	16

Alle Konzentrationsangaben entsprechen µg/ml

*bei Cefoxitin wurde für A_{PbP} nicht 0.5, sondern 0.1 µg/ml eingesetzt (siehe Curtis

Tabelle 37: Gegenüberstellung der errechneten Werte und MHK-Werte von Penicillinen

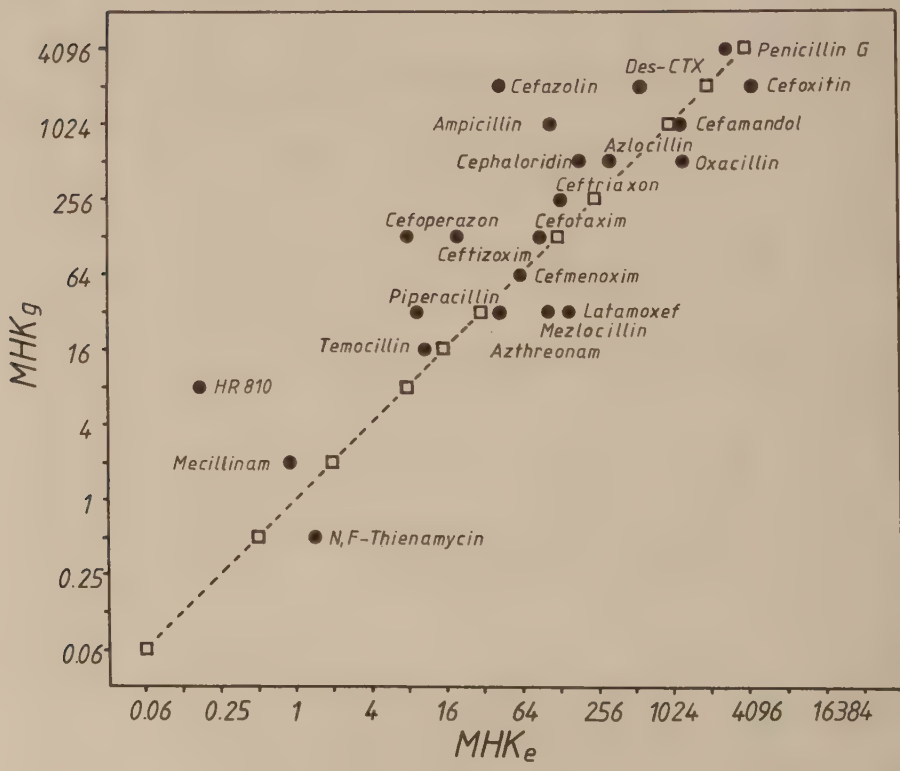
Penicilline	E. cloacae 5		149M		352M		208		E. coli DC0 Tk	DC2 Tk
	MHK_e	MHK_g	MHK_e	MHK_g	MHK_e	MHK_g	MHK_e	MHK_g	MHK_g	MHK_g
Penicillin G	1308	>2048	380	>2048	519	>2048	5827	>2048	>2048	>2048
Ampicillin	551	2048	69	2048	120	2048	264	1024	>2048	>2048
Oxacillin	4381	512	838	512	1475	512	2210	512	>2048	2048
Mecillinam	0.005	0.5	0.01	1	0.01	1	0.03	2	512	128
Piperacillin	0.5	64	1.3	32	7	256	1	32	2048	1024
Azlocillin	470	2048	161	2048	590	2048	525	512	>2048	>2048
Mezlocillin	0.4	64	0.3	64	7	128	50	32	1024	512
Temocillin	7.5	16	3.7	16	35	32	7.3	16	128	64
N,F-Thienamycin	1	0.5	0.83	0.5	0.93	0.5	0.24	0.5	0.25	0.25
Azthreonam	33	16	165	32	240	32	272	32	64	64

Alle Konzentrationsangaben erfolgten in µg/ml

Zur Berechnung von t_g wurde die Konzentration der MHK zugrunde gelegt, dies galt auch für die Cephalosporine. MHK_e = errechnete MHK, MHK_g = gemessene MHK.

Zu einer noch besseren Korrelation der errechneten und der gemessenen MHK-Werte gelangte man (Abb. 27), wenn die MHK_e-Werte für E. coli DCO Tk nach einer leicht modifizierten Formel berechnet wurden. Statt t_g wurde ein Faktor von 20 eingeführt, da es sich um relative Meßung der verschiedenen Parameter gehandelt hatte. Außerdem wurde die MHK des sensiblen E. coli DCO ohne ß-Laktamase dazugezählt, auf diese Weise konnte die Grundverträglichkeit berücksichtigt werden.

Abb. 27: Vergleich von MHK_g mit MHK_e für E. coli DCO Tk



-□-Idealwert, wenn MHK_g und MHK_e genau gleich wären

3.5. Reinigung und Charakterisierung der Cephalosporinase aus E. cloacae

Die Cephalosporinasen aus E. cloacae 208, 5, 149M und 352M wurden angereichert und konnten in nur drei Schritten fast bis zur Homogenität gereinigt werden.

3.5.1. Reinigung und Anreicherung

Zellaufschluß

Der Zellaufschluß wurde in 0.05 M K,Na-Phosphatpuffer pH 7.0 mittels Ultrabeschallung durchgeführt. Der klare Überstand, nach Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation gewonnen, wurde über Nacht dialysiert und als Rohextrakt definiert.

Ultrazentrifugation

Ultrazentrifugation des entsalzten Rohextraktes erfolgte für zwei Stunden bei 140 000 g. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand weiter gereinigt. Die spezifische Aktivität des Ultrazentrifugationsüberstandes betrug nur noch 60 - 85 % der des Rohextraktes, 15 - 40 % verblieben im Sediment.

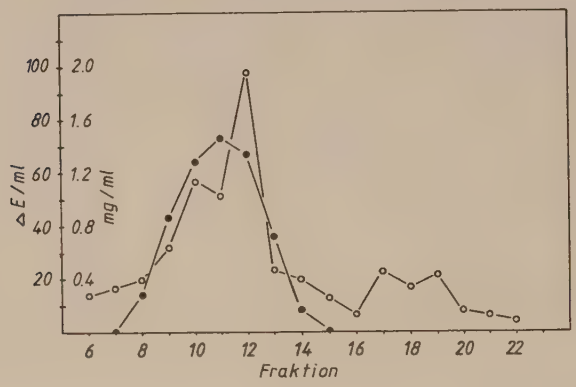
DE 52-Cellulose-Ionen-Austauschchromatographie

Hierbei konnte die Tatsache, daß die IP's der Cephalosporinasen im basischen pH-Bereich lagen genutzt werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen waren die ß-Laktamasen gegenüber dem Anionenaustauscher positiv geladen, so daß die Cephalosporinasen nicht mit dem Austauscher reagierten, sondern fast vollständig im Ausschlußvolumen erschienen und ein Großteil des restlichen Proteins an die Säule gebunden wurde (Abb.28a). Nach diesem Schritt lagen die Enzyme weitgehend gereinigt vor. Der Extrakt wurde für die kinetischen Untersuchungen verwendet.

Sephacryl S-300-Chromatographie

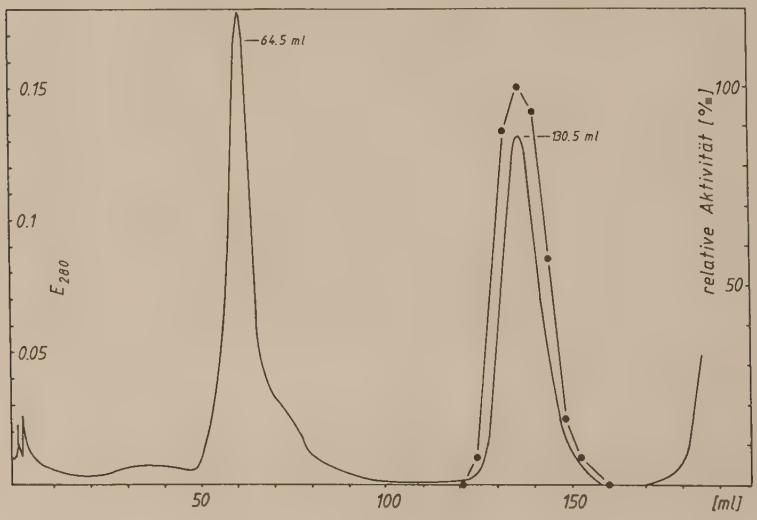
Zur Bestimmung des Molekulargewichts der ß-Laktamasen war eine vollständige Reinigung über eine S 300-Säule notwendig. Die Enzyme eluierten als scharfer Peak in den Fraktionen 39 - 44, welches einem Elutionsvolumen von 135 ml entsprach, im Bereich von 30 000 - 40 000 Molekulargewicht (Abb.28b).

Abb. 28a: Elutionsdiagramm der ß-Laktamase aus E. cloacae 149M bei DE 52-Chromatographie



Aktivität mit PADAC bei 578 nm (●), Protein bei 280 nm (○).
Die Chromatographie erfolgte in 0.03 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0.

Abb. 28b: Elutionsdiagramm der ß-Laktamase aus E. cloacae 149M bei S-300-Chromatographie



Die Chromatographie erfolgte in 0.05 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0 + 0.1 M NaCl, ΔE mit PADAC (●), Protein (—)

Tabelle 38: Reinigung und Anreicherung der ß-Laktamasen aus vier E. cloacae-Stämmen

ß-Laktamase aus E. cloacae	Reinigungs-schritt	Gesamt-volumen {ml}	Gesamt-protein {mg}	Gesamt-aktivität {U}	spezifische Aktivität {U/mg}	Anreiche-rungs Faktor	Ausbeute %
208	Rohextrakt	8	422	1256	2.98	-	100
	Ultrazentr.	7.5	250.5	984.4	3.93	1.32	78.4
	DE 52	10	17.7	750	42.4	14.2	60
	S 300	4	1.92	130.6	67.92	23	34.3
149M	Rohextrakt	8.5	266.5	1010	3.8	-	100
	Ultrazentr.	8	210.8	725.2	3.44	0.9	72
	DE 52	9.5	9.1	486	53.6	14.1	48
	S 300	4.2	0.8	203.6	255.9	67.34	20.2
5	Rohextrakt	9	601.2	1521.1	2.5	-	100
	Ultrazentr.	7	315.9	938.95	2.76	1.1	62
	DE 52	12	28.8	684	24	9.5	45
	S 300	2	1.71	47	26.5	9.3	32.4
352M	Rohextrakt	7.2	267.1	1710	6.4	-	100
	Ultrazentr.	6.5	237.5	1462.5	6,14	0.95	85.5
	DE 52	10	15.6	1300	83.3	13	76
	S 300	4.4	3.5	206.6	13.4	2.1	8.3

Die Enzymaktivität wurde mit 0.1 mM Cephaloridin bestimmt.
Der Verlust an Enzym nach Ultrazentrifugation betrug für die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 21%, für die ß-Laktamase aus Stamm 149M 28%, aus Stamm 5 38% und aus Stamm 352M 14.5%.

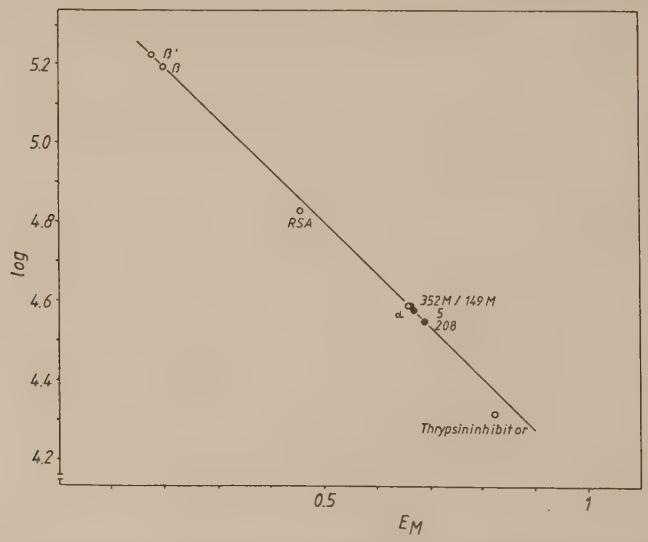
Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und auf etwa drei ml eingeengt. Mit diesem Schritt wurde die Anreicherung abgeschlossen (Tabelle 38). Die geringe Ausbeute nach S 300-Chromatographie war auf Aktivitätsverlust nach Einfrieren des DE 52-Extraktes zurückzuführen.
Mit dem S 300-Extrakt wurde das genaue Molekulargewicht mittels SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

3.5.2. Eigenschaften der gereinigten ß-Laktamasen

3.5.2.1. Bestimmung des Molekulargewichts

Das Molekulargewicht wurde durch SDS-Gelelektrophorese bestimmte. Anhand der elektrophoretischen Mobilität (EM) (Tabelle 39) ließ sich für die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 eine Molekulargewicht von 35 000, für die ß-Laktamase aus E. cloacae 5 von 38 000, aus E. cloacae 149M und aus E. cloacae 352M von 39 000 berechnen (Abb. 29).

Abb. 29: Eichkurve zur Ermittlung des Molekulargewichts



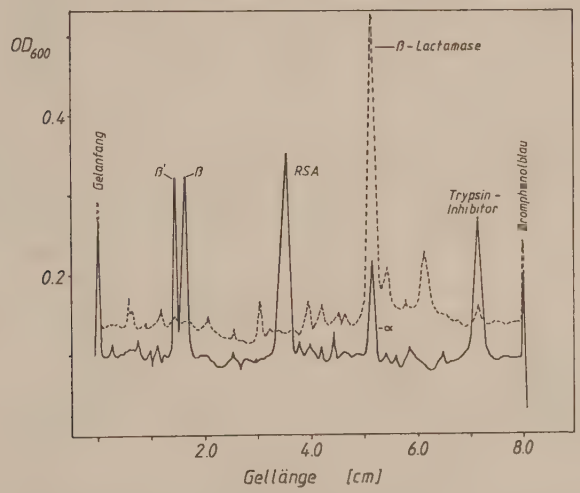
Zur quantitative Auswertung wurde die Lage der Proteinbanden mittels Gel-Scanner graphisch dargestellt (Abb. 30 am Beispiel von der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M). Der Peak der

Tabelle 39: EM-Werte der gereinigten ß-Laktamasen

ß-Laktamase aus E. cloacae	Proteinbande {cm}	Bromphenolblau {cm}	EM
208	5.6 / 5.6	8.1 / 8.1	0.69 / 0.69
5	5.5 / 5.2	8.3 / 7.7	0.667/ 0.675
149M	5.25	7.9	0.66
352M	5.5 / 5.3	8.4 / 8.0	0.655/ 0.66

EM (elektrophoretische Mobilität) = cm Proteinbande / cm Bromphenolblau
EM-Werte der Eichproteine: ß'-Untereinheit der Ribonuklease 0.18, ß-Untereinheit der Ribonuklease 0.2, RSA 0.456, α-Untereinheit der Ribonuklease 0.66, Trypsin-Inhibitor 0.826.

Abb. 30: Graphische Darstellung der Lage der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M und Vergleich mit den Eichproteinen



α-Untereinheit der Ribonuklease korrelierte mit dem Peak der ß-Laktamase (MG = 39 000). Diese sehr empfindliche Methode zeigte noch geringe Verunreinigungen des Enzymextraktes, die mit dem bloßen Auge nicht mehr zu erkennen waren.

3.5.2.2. "peptide mapping" der ß-Laktamasen

Da isoelektrischer Punkt (3.1.) und Molekulargewicht (3.5.2.1.) der vier untersuchten ß-Laktamasen aus E. cloacae zum Teil recht verschieden waren, stellte sich die Frage, ob grundsätzliche Unterschiede im Aufbau der Enzyme bestanden, zumal sich bei der Enzymaktivität die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 durch signifikant bessere Aktivität gegen dritte Generation Cephalosporine und die ß-Laktamase aus E. cloacae 5 durch relativ schlechte Hydrolyse von älteren Cephalosporinen auszeichnete (3.4.1.1.).
Zur Klärung dieser Frage, wurden die vier gereinigten Enzyme (nach S 300-Chromatographie) einem "peptide mapping", d.h. Verdauung durch eine Peptidase (Pronase) unterzogen und die Bruchstücke anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Tabelle 40).

Tabelle 40: Elektrophoretische Mobilität der Bruchstücke nach Verdauung durch Pronase

	ß-Laktamase aus E. cloacae								Eichpr.	
	5		149M		352M		208			
BPB {cm}	7.9	EM	8.1	EM	8.2	EM	8.2	EM	7.8	EM
PB {cm}	3.4	0.43	3.4	0.42	3.5	0.44	3.5	0.43	0.4	0.051
	3.85	0.49	3.9	0.48	4.0	0.5	4.1	0.5	0.5	0.064
	5.45	0.69	5.55	0.69	5.7	0.71	5.8	0.71	1.2	0.22
									3.2	0.42
									5.5	0.71

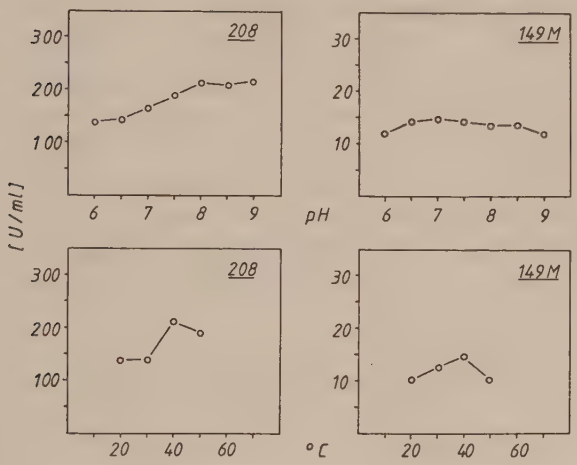
BPB = Bromphenolblau-Bande, PB = Proteinbande, EM = elektrophoretische Mobilität (PB:BPB)
Eichproteine: ß'-, ß-Untereinheit, RSA, α-Untereinheit der Ribonuklease und Trypsininhibitor

Es traten drei Hauptbruchstücke auf, die in ihrer EM sehr ähnlich waren. Offensichtlich ist die grundlegende Struktur der Enzyme gleich, wenn andere, verschiedene Bruchstücke entstanden, waren sie so klein, das sie nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

3.5.2.3. pH- und Temperaturoptimum

Zur weiteren Charakterisierung der ß-Laktamasen wurden mit dem DE 52-Extrakt pH- und Temperatur-Optimum mit 0.1 mM Cephalothin als Substrat bestimmt (Abb. 31).

Abb. 31: pH- und Temperaturoptimum der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 und 149M



Der optimale pH für die Reaktion lag bei 8.0. Allerdings zeigte nur die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 ein scharfes pH-Optimum, bei den ß-Laktamasen der anderen Organismen blieb die Aktivität über den gemessenen Bereich relativ konstant. Das Temperatur-Optimum der Cephalosporinasen lag bei 40°C, unterhalb von 35°C nahm die Aktivität rasch ab.

3.5.2.4. Hemmbarkeit der ß-Laktamasen

Die gereinigten ß-Laktamasen wurden durch 0.1 mM Cloxacillin vollständig, durch 1 mM pCMB überhaupt nicht gehemmt. Bei zu hohen Enzymkonzentrationen im photometrischen Enzymtest kam es zur Hemmung der Enzymaktivität, darum mußten die Extrakte immer optimal verdünnt werden. Ebenso konnte bei höheren Substratkonzentrationen (siehe auch Kinetiken) Substratüberschuß-Hemmung beobachtet werden.

3.6. Kinetische Charakterisierung der ß-Laktamasen

3.6.1. Aufnahme von Substratsättigungskurven

Substratsättigungskurven wurden für Cephaloridin, Cephalothin, Cefazolin, Cephacetril und Cefotiam mit allen vier gereinigten ß-Laktamasen (DE 52-Extrakte) aufgenommen, für Cefamandol nur mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 5.

Substratsättigungskurve mit Cephaloridin

In Abb. 32 und 33 sind stellvertretend die Substratsättigungskurven mit den Enzymen aus Stamm 208 und 352M aufgeführt. Cephaloridin zeichnete sich durch eine linear ansteigende Sättigungskurve mit einem relativ kurzen Sättigungsbereich aus. Bei höheren Substratkonzentrationen kam es zur Substratüberschuß-Hemmung (mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M und 208 ab 200 µM, aus 149M ab 170 µM und aus Stamm 5 ab 160 µM). Vollständige Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit fand bei ß-Laktamase aus E. cloacae 5 mit 200 µM Cephaloridin statt, aus Stamm 149M bei 350 µM und aus 208, sowie 352M bei 320 µM Substrat. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit der ß-Laktamase aus 208 und 5 wurde bei 150 µM, die der ß-Laktamase aus Stamm 352M bei 180 µM und der aus Stamm 149M bei 160 µM gemessen.

Abb. 32: Substratsättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plot für Cephaloridin mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 208

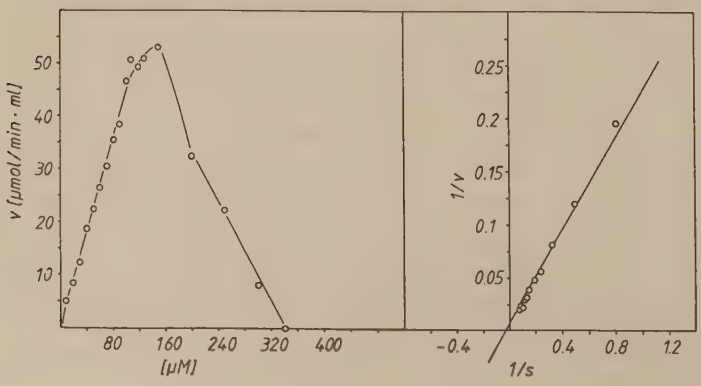
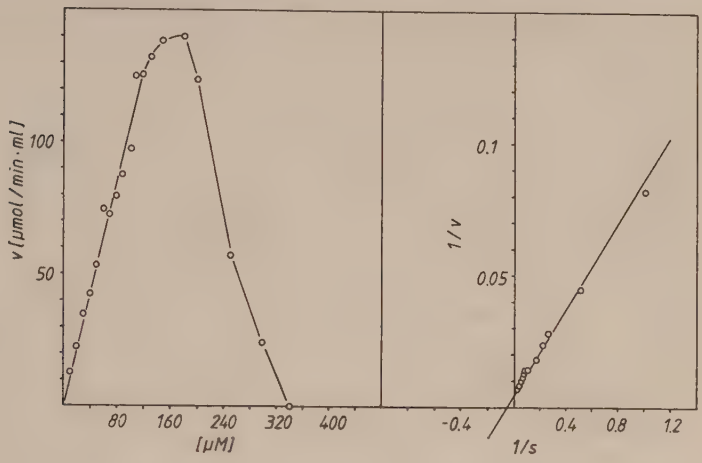


Abb. 33: Substratsättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plot für Cephaloridin mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M



Die Hemmung der Hydrolyse-Reaktion durch Substratüberschuß nahm in Korrelation zum Abbau des Substrats auch wieder ab, eine irreversible Hemmung lag nicht vor. Die Hydrolyse von 350 µM Cephaloridin durch die ß-Laktamase aus E. cloacae 149M wurde anhand einer Zeit-Umsatz-Kurve bis zum völligen Verbrauch des Substrats und Erliegen der Reaktion gemessen (Abb. 34). Substrathemmung und "kooperatives" Verhalten bei niedrigen Substratkonzentrationen wurde hierbei besonders deutlich.

Die Bestimmung der $V_{max}/2$-Werte erfolgte direkt aus den Sättigungskurven, die der K_s-Werte durch Lineweaver-Burk- und Hanes-Auftragung. Die $V_{max}/2$-Werte waren niedriger als die graphisch ermittelten K_s-Werte (Tabelle 41). Vor allem in der Hanes-Auftragung wurde deutlich, daß mit Cephaloridin als Substrat keine Michaelis-Menten-Kinetik vorlag.

Substratsättigung mit Cephalothin

Im Gegensatz zu Cephaloridin wies Cephalothin eine hyperbolische Sättigungkurve auf (Abb. 35 und 36). Die $V_{max}/2$-Werte und die durch graphische Auftragung ermittelten K_s-

Abb. 34: Zeit-Umsatz-Kurve von 350 µM Cephaloridin mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 149M

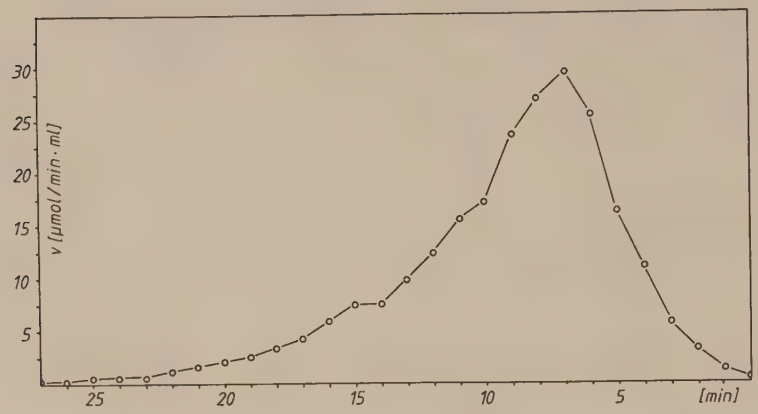


Abb. 35: Substratsättigung und Lineweaver-Burk-Auftragung von Cephalothin mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 149M

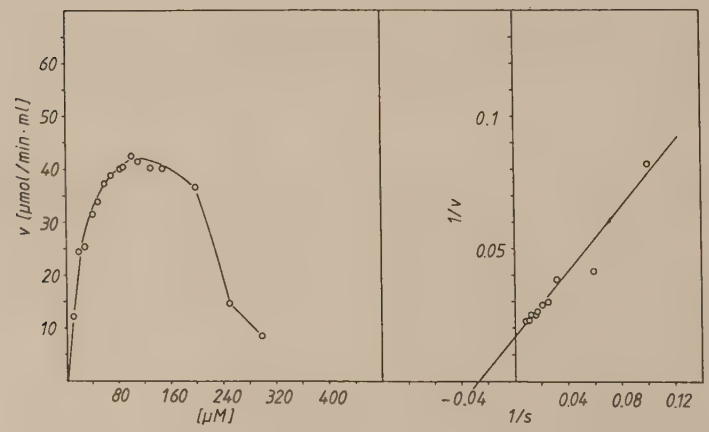
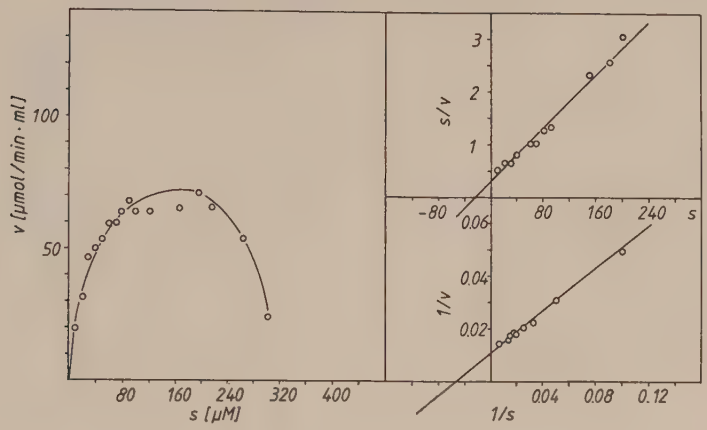


Abb. 36: Substratsättigung und Linewaver-Burk-, sowie Hanes-Auftragung von Cephalothin mit der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M



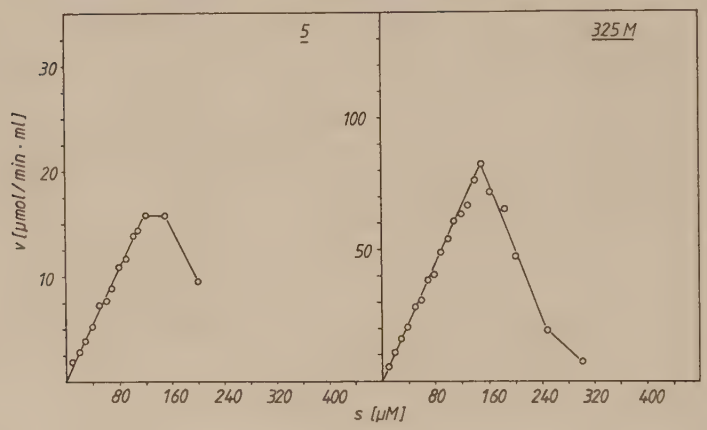
Werte (Tabelle 41) waren sich sehr ähnlich. Der Sättigungsbereich hielt länger an als bei Cephaloridin, Substrathemmung trat aber bei allen vier ß-Laktamasen ab 200 µM Cephalothin ebenfalls auf. Vollkommene Hemmung wurde nicht ausgetestet, sie lag aber weit höher als 300 µM Substrat. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit war für die ß-Laktamase aus E. cloacae 352M bei 90 µM, für die aus Stamm 149M bei 100 µM, aus Stamm 208 bei 130 µM und aus Stamm 5 bei 60 µM erreicht.

Substratsättigungskurve mit Cefazolin

Cefazolin wies wie Cephaloridin eine nicht-hyperbolische Substratsättigungskurve und einen nur kurzen Sättigungsbereich auf (Abb. 37), $V_{max}/2$-und K_s-Werte differierten. Die ß-Laktamase aus E. cloacae 5 und aus Stamm 208 wurde ab 180 µM, die aus Stamm 352M bei 160 µM und die aus Stamm 149M bei 120 µM Cefazolin gehemmt. Vollständige Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit lag für alle vier ß-Laktamasen um 300 µM Cefazolin. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit war mit dem Enzym aus Stamm

5 bei 120 µM, aus 352M bei 150 µM, aus 149M bei 110 µM und aus 208 bei 180 µM Cefazolin erreicht.

Abb. 37: Substratsättigungskurven für Cefazolin mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 352M und 5



Substratsättigungskurven mit Cephacetril

Cephacetril wurde ausgewählt. weil es wie Cephalothin am C_3-Atom einen Essigsäure-Rest trägt.
Die Substratsättigungskurven waren nicht so ausgeprägt kooperativ wie die von Cephaloridin und Cefazolin, aber auch nicht so eindeutig hyperbolisch wie bei Cephalothin (Abb. 38). Die K_s-Werte lagen, bis auf die des Enzyms aus E. cloacae 208 (Tabelle 41), im Bereich der $V_{max}/2$-Werte. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag mit der ß-Laktamase aus Stamm 208 bei 140 µM, die der ß-Laktamase aus Stamm 5 bei 150 µM, aus 149M bei 90 µM und aus 352M bei 130 µM Cephacetril.

Substratsättigungskurven mit Cefotiam

Der Verlauf der Substratsättigungskurven mit Cefotiam (Abb. 39) war denen von Cephalothin und Cephacetril ähnlich. Die K_s- und $V_{max}/2$-Werte korrelierten (Tabelle 41) weitgehend, mit Ausnahme der ß-Laktamase aus E. cloacae 208.

Abb. 38: Substratsättigungskurven für Cephacetril mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 5

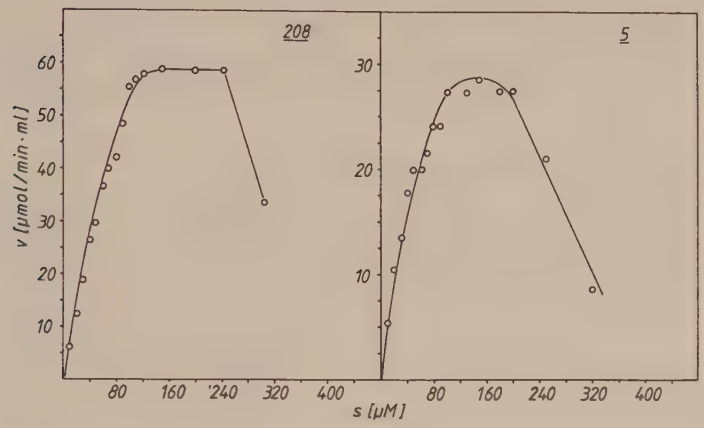
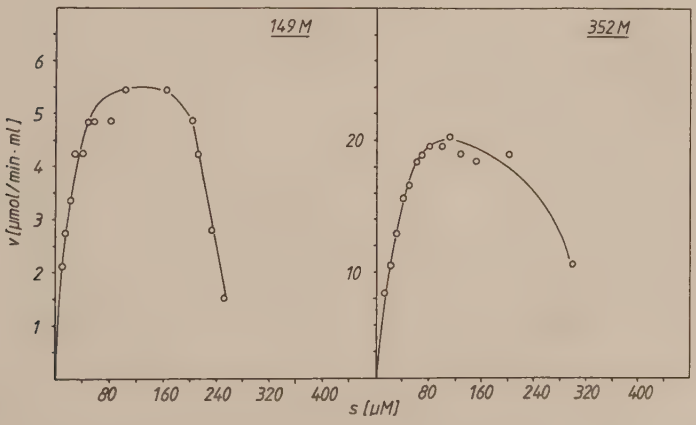


Abb. 39: Substratsättigungskurven für Cefotiam mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 352M und 149M

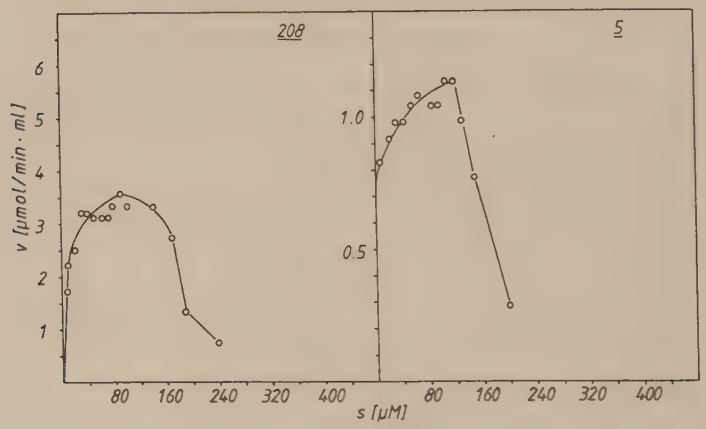


Die höchste Enzymaktivität wurde bei der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M ab 110 µM, bei der aus 149M ab 100 µM, aus Stamm 5 ab 70 µM und aus Stamm 208 ab 130 µM gemessen. Substratüberschußhemmung konnte bei allen vier ß-Laktamasen ab 200 µM Cefotiam beobachtet werden, vollkommene Hemmung lag im Bereich von 300 µM Cefotiam, bei den ß-Laktamasen aus E. cloacae 352M und 208 auch höher.

Substratsättigungskurven mit Cefamandol

Diese Messungen wurden nur für die Enzyme aus E. cloacae 208 und 5 durchgeführt. Der Kurvenverlauf war hyperbolisch, die $V_{max}/2$- und K_s-Werte relativ ähnlich. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit dem Enzym aus Stamm 208 bei 100 µM, mit dem aus Stamm 5 bei 110 µM Cefamandol erreicht, Hemmung durch Substratüberschuß trat bei beiden ß-Laktamasen ab 110 µM Cefamandol auf, vollständige Hemmung lag im Bereich von 300 µM Substrat (Abb. 40).

Abb. 40: Substratsättigungskurven für Cefamandol mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 5



Zusammenfassend ließ sich sagen, daß die Substratsättigungskurven mit den verschiedenen Cephalosporinen nicht der Michaelis-Menten-, sondern offensichtlich einer Kinetik höherer

Ordnung folgten. In Abhängigkeit vom Substrat trat mehr oder weniger ausgeprägtes kooperatives Sättigungsverhalten auf, $V_{max}/2$- und K_s-Werte differierten zum Teil erheblich. Die maximale Enzymaktivität lag meist bei 100 µM des jeweiligen Substrats, Substratüberschußhemmung erfolgte im allgemeinen ab 200 µM Substrat.

3.6.2. Enzymkinetische Meßdaten

$V_{max}/2$-, K_s- und I_{50}-Werte

Die Affinitätskonstanten der sechs untersuchten Cephalosporine wurden zum einen direkt aus den Substratsättigungskurven abgelesen, dabei die höchste gemessene Enzymaktivität zugrunde gelegt und so $V_{max}/2$ berechnet. Zum anderen wurde eine Linearisierung mittels Lineweaver-Burk-, bzw. Hanes-Plot vorgenommen und K_s errechnet.
Die $V_{max}/2$- und K_s-Werte waren sehr verschieden, die durch die Umformung der Kurve gewonnenen Daten lagen deutlich höher, als die $V_{max}/2$-Werte direkt aus der Sättigungskurve (Tabelle 41). Der Vergleich mit den mit Rohextrakt gemessenen I_{50}-Werten (die I_{50}-Werte wurden ebenfalls in µM umgerechnet) ergab eine Korrelation zwischen den K_s- und den ebenfalls sehr hohen I_{50}-Werten, vor allem bei Cephaloridin und Cefazolin, in diesen Fällen war $V_{max}/2$ deutlich niedriger. Bei Cefotiam und Cefamandol dagegen befanden sich die Werte im gleichen Bereich, der I_{50}-Wert von Cefotiam war nur um die Hälfte niedriger als $V_{max}/2$ und K_s.

Ermittlung der Hill-Koeffizienten

Die ß-Laktamasen aus E. cloacae zeigten mit einigen Substraten nicht-hyperbolische Sättigungskurven. Dies ließ einen Rückschluß auf kooperative Effekte in der Substratbindung zu. Ein Maß für die Kooperativität einer Sättigungskurve ist der Hill-Koeffizient (Abb. 41), er gibt aber keinen Hinweis auf die mögliche Anzahl von Bindestellen oder aktiven Zentran eines Enzyms. Im Bereich der Halbsättigung ist das Hill-Diagramm durch einen linearen Verlauf charakterisiert, die Steigung n_H dieses linearen Abschnitts wird als Hill-Koeffizient

Tabelle 41: $V_{max}/2$-, K_s- und I_{50}-Werte von Cephalosporinen für die ß-Laktamasen der vier E. cloacae-Stämme

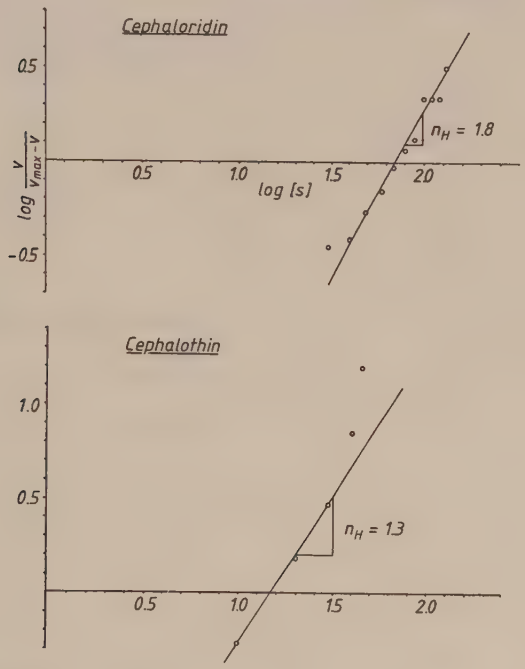
	ß-Laktamase aus E. cloacae											
	208			352M			149M			5		
Cephalosporin	$V_{max}/2$	K_s	I_{50}	$V_{max}/2$	K_s	I_{50}	$V_{max}/2$	K_s	I_{50}	$V_{max}/2$	K_s	I_{50}
Cephaloridin	64	334	450	70	334	408	81	500	480	72	250	641
Cephalothin	30	53	110	20	22	67	18.5	31	48	15.5	31	79
Cefazolin	68	666	839	75	848	629	62	588	713	60	714	672
Cephacetril	45	476	-	24.8	47	-	18	55.5	-	30	77	-
Cefotiam	45	118	50	24	48	6.2	15	20	20	17	26	21.7
Cefamandol	10	10.3	5.8	-	-	-	-	-	-	6.5	7.6	2.5

Alle Konzentrationsangaben erfolgten in µM.

Die Bestimmung der I_{50}-Werte erfolgte mit Rohextrakt (siehe Tabelle 20).

bezeichnet (Bisswanger 1979).

Abb. 41: Hill-Koeffizient von Cephaloridin und Cephalothin für die ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 5



n_H = Hill-Koeffizient

Die n_H-Werte für Cephaloridin von 2.0 (ß-Laktamase aus E. cloacae 208) und 1.8 (ß-Laktamase aus E. cloacae 5) belegten den positiv kooperativen Effekt bei steigender Substratkonzentration. Obwohl die Substratsättigungskurve mit Cephalothin als Substrat einen hyperbolischen Verlauf zu nehmen schien, konnte bei Berechnung des Hill-Koeffizienten ebenfalls positiv kooperative Substratbeeinflußung gefunden werden. Die n_H-Werte für Cephalothin lagen bei 1.6 (ß-Laktamase aus E. cloacae 208) und 1.3 (ß-Laktamase aus E. cloacae 5).

Vergleich der $V_{max}/2$- und K_s-Werten von Rohextrakt und gereinigter ß-Laktamase

Mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 352M waren bereits mit dem Rohextrakt kinetische Untersuchungen vorgenommen worden. Die Substratsättigungskurven unterschieden sich nicht wesentlich von denen mit gereinigtem Enzym (Abb. 42, am Beispiel der ß-Laktamase aus E. cloacae 352M). Die Substrathemmung setzt aber mit allen Substraten bei Verwendung von Rohextrakt bereits ab 100 µM ein. Die $V_{max}/2$- und K_s-Werte mit Rohextrakt und angereichertem Enzym lagen in der gleichen Größenordnung (Tabelle 42).

Tabelle 42: Vergleich der $V_{max}/2$- und K_s-Werten vor und nach Reinigung der ß-Laktamasen aus E. cloacae 208 und 352M

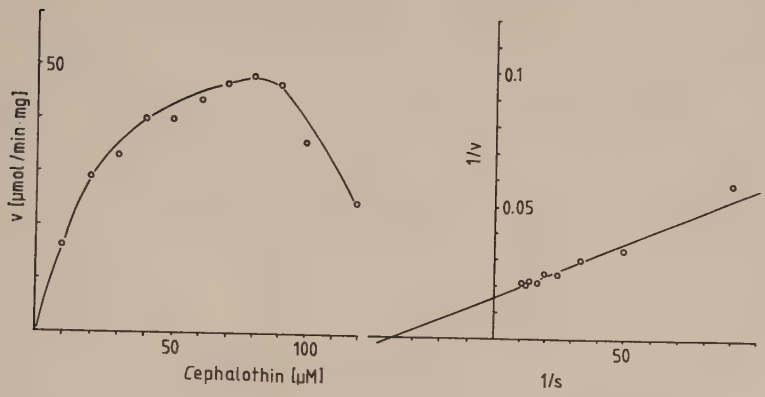
	ß-Laktamasen aus E. cloacae							
	208				352M			
Cephalosporin	Rohextrakt		nach DE 52		Rohextrakt		nach DE 52	
	$V_{max}/2$	K_s	$V_{max}/2$	K_s	$V_{max}/2$	K_s	$V_{max}/2$	K_s
Cephaloridin	48	417	64	334	44	670	70	334
Cephalothin	55	55	30	53	26	26	20	22
Cefazolin	36	833	68	666	41	333	75	848
Cefotiam	39	220	45	118	24	70	24	48

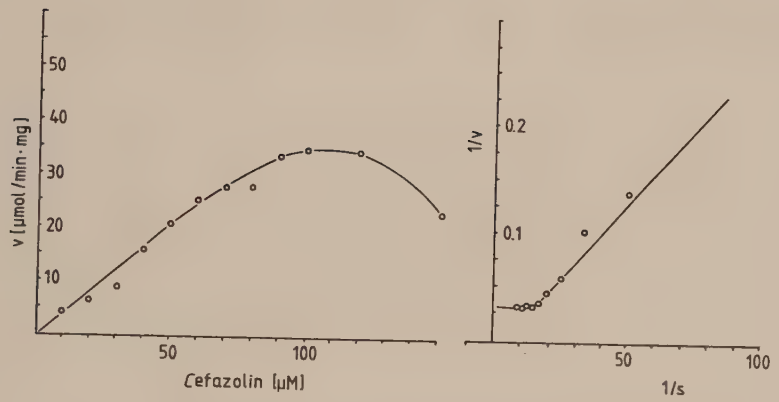
Alle Konzentrationsangaben erfolgten in µM

3.6.3. Ermittlung von Inhibitorkonstanten

K_i- und I_{50}-Werte von Cefmenoxim, Ceftazidim, Ceftizoxim, Azthreonam und Cefotaxim wurden mit der angereicherten ß-Laktamase aus E. cloacae 208 mit verschiedenen Substraten (Cephaloridin, Cephalothin, Cefotiam und Cefazolin) bestimmt. Die K_i-Werte und Art der Hemmung konnten durch Dixon-Auftragung ermittelt werden, als I_{50}-Wert wurde diejenige Menge an Inhibitor bezeichnet, bei der die Hydrolyse des jeweiligen Substrats um 50% gehemmt worden war.

Abb. 42: Substratsättigungskurven mit Cephalothin und Cefazolin mit Rohextrakt von E. cloacae 352M

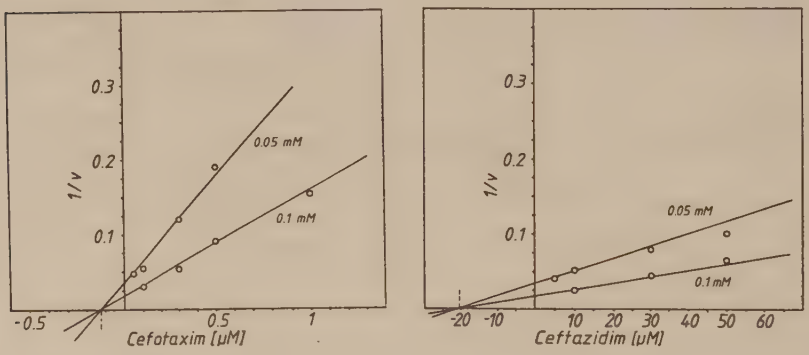




K_i-Wert-Bestimmung mit Cephaloridin als Substrat

Mit Cephaloridin als Substrat war der Hemmtyp mit Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftizoxim und Cefmenoxim nicht-kompetitiv (Abb. 43, am Beispiel von Cefotaxim und Ceftazidim), der K_i-Wert somit gleich dem I_{50}-Wert (Tabelle 43).

Abb. 43: Hemmtyp von Cefotaxim und Ceftazidim mit Cephaloridin als Substrat



Mit Azthreonam als Inhibitorgestaltete sich die Bestimmung der Inhibitorkonstanten schwierig. Dei Hemmung der Anfangsgeschwindigkeit war zunächst gering, nach 0.5 min aber wurde die Reaktion stärker gehemmt. Legte man die Reaktion in der ersten halben Minute zugrunde, ergab die Dixon-Auftragung unkompetitive Hemmung, legte man die Reaktion der zweiten Minute zugrunde, ergab sich nicht-kompetitive Hemmung (Abb. 44).

K_i-Wert-Bestimmung mit Cephalothin als Substrat

Mit Cephalothin als Substrat war der Hemmtyp mit den Aminothiazol-Cephalosporinen kompetitiv (Abb 45, am Beispiel von Ceftizoxim), für Ceftazidim war die Bestimmung der Inhibitorkonstanten schwierig, die Werte wurden extrapoliert (Abb. 45) Wie schon mit Cephaloridin als Substrat ergaben sich für

Abb. 44: Hemmtyp von Azthreonam mit Cephaloridin als Substrat

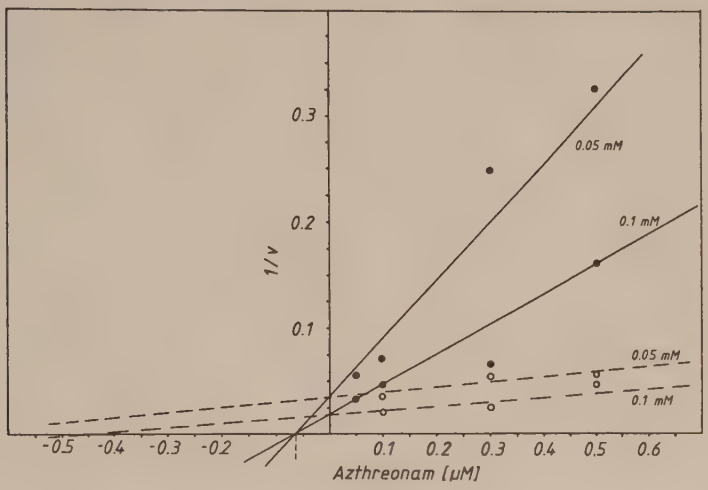
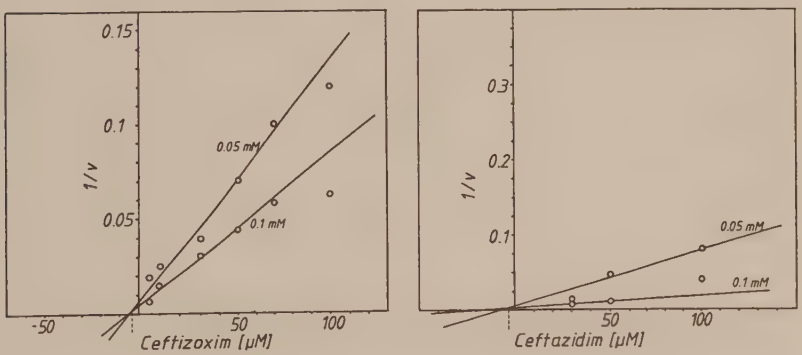
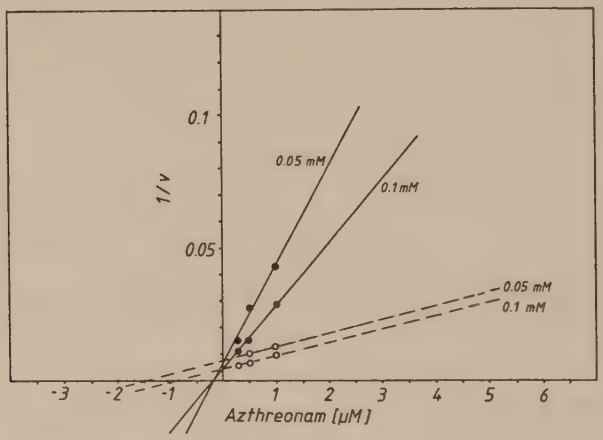


Abb. 45: Hemmtyp von Ceftizoxim und Ceftazidim mit Cephalothin als Substrat



Azthreonam zwei Hemmtypen, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der ersten halben Minute zugrunde gelegt, war die Art der Hemmung unkompetitiv; legte man die zweite Minute zugrunde, konnte nicht-kompetitive Hemmung ermittelt werden (Abb 46).

Abb. 46: Hemmtyp von Azthreonam mit Cephalothin als Substrat



K_i-Wert-Bestimmung mit Cefotiam als Substrat

Mit Cefotiam als Substrat war die Art der Hemmung durch die dritte Generation Cephalosporine kompetitiv (Abb. 47, am Beispiel von Cefmenoxim). Für Ceftazidim mußten die Werte extrapoliert werden (Abb. 47), Azthreonam verhielt sich sowohl zu Anfang der Reaktion wie auch nach zwei Minuten als kompetitiver Inhibitor, die Hemmung nahm im Verlauf der Reaktion zu, somit war der K_i nach 2 Minuten niedriger (Tabelle 43).

K_i-Wert-Bestimmung mit Cefazolin als Substrat

Mit Cefazolin als Substrat war der Hemmtyp wie schon bei Cefotiam und Cephalothin kompetitiv (Abb. 48, am Beispiel von Ceftizoxim und Cefmenoxim), für Ceftazidim aber unkompetitiv.

Bei niedrigen Konzentrationen von Cefotaxim, Cefmenoxim, Ceftazidim und Ceftriaxon kam es zu erheblicher Aktivierung der Hydrolyse von Cefazolin (Tabelle 44). Mit 0.1 mM Cefazolin

Abb. 47: Hemmtyp von Cefmenoxim und Ceftazidim mit Cefotiam als Substrat

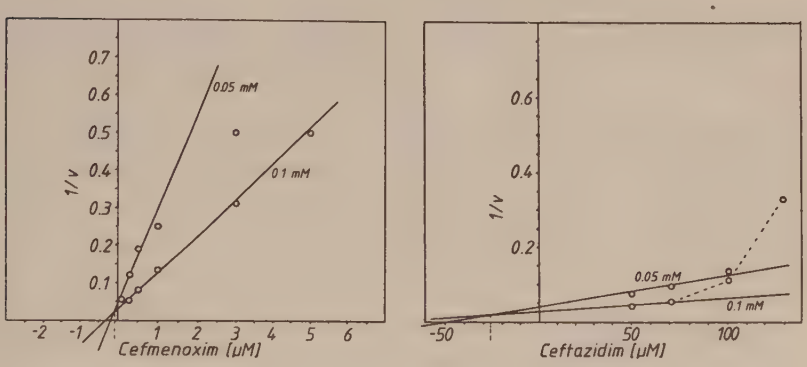


Abb. 48: Hemmtyp von Ceftizoxim und Cefmenoxim mit Cefazolin als Substrat

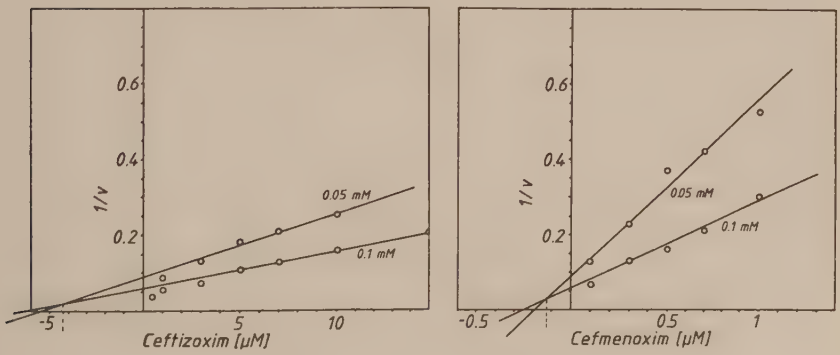


Tabelle 43: K_i- und I_{50}-Werte mit verschiedenen Substraten von Cefmenoxim, Ceftazidim, Ceftizoxim, Cefotaxim und Azthreonam (µM)

Substrat	Cephalothin		Cephaloridin		Cefotiam		Cefazolin	
Hemmtyp	kompetitiv		nicht-komp.		kompetitiv			
Inhibitor	K_i	I_{50}	K_i	I_{50}	K_i	I_{50}	K_i	I_{50}
Cefmenoxim	0.17	0.33	0.14	/	0.12	0.3	0.13	0.25
Ceftazidim	3.5	33	21	/	27	50	n.b.	25
Ceftizoxim	4	6.5	3	/	4	6.5	4.5	6.2
Cefotaxim	0.1	0.3	0.125	/	0.15	0.33	0.06	0.21
Azthreonam	0.19 (nicht-komp.)	/	0.065	/	0.06	0.18	n.b.	n.b.

Alle Konzentrationsangaben erfolgten in µM, die K_i-Werte für Ceftazidim wurden extrapoliert, da außer mit Cephaloridin als Substrat kein linearer Dixon-Plot möglich war.
I_{50} = Schnittpunkt der Geraden mit 0.1 mM Substrat mit der x-Achse im Dixon-Plot.
Die in der Tabelle angegebenen K_i-Werte für Azthreonam wurden anhand der Reaktion nach zwei Minuten errechnet. In der ersten halben Minute war der Hemmtyp mit Cephalothin und Cephaloridin unkompetitiv, bei Cefotiam aber ebenfalls kompetitiv mit niedrigeren Werten (K_i = 0.49, I_{50} = 0.71).

Tabelle 44: Aktivierung der Hydrolyse von 0.1 mM Cefazolin

Ceftazidim		Cefmenoxim		Ceftizoxim		Cefotaxim	
µM	U/ml	µM	U/ml	µM	U/ml	µM	U/ml
10	27	0.05	20.6	1	19.1	0.05	20.6
5	27.8	0.02	22.2	0.5	27	0.02	25.4
3	28.6	0.01	23.8	0.2	27		
1	30.3						
0.5	30.3						
0.2	27						

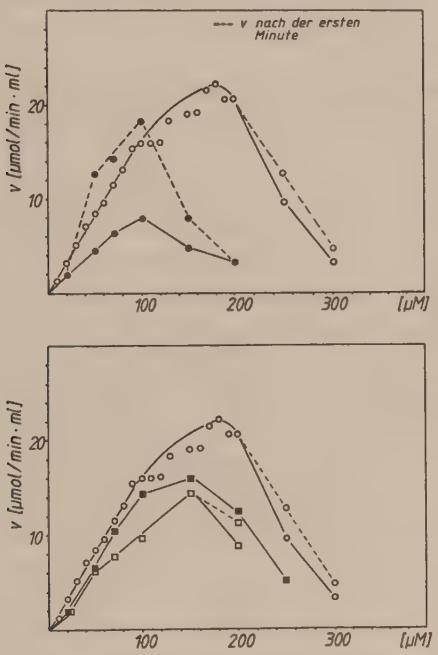
ohne Effektor 16.7 U/ml

als Substrat kam es nach Zugabe von 10 µM Ceftazidim zu intensiver Aktivierung der Reaktion, bei 0.05 mM Cefazolin als Substrat konnte dieser ausgeprägte Einfluß nicht beobachtet werden, die Aktivierung war unwesentlich.
Auch mit den anderen dritte Generation Cephalosporine wurde der aktivierende Einfluß besonders bei hohen Substratkonzentrationen deutlich.

Einfluß von Aminothiazol-Cephalosporinen auf die Substratsättigungskurve

Der Einfluß von 30 µM Ceftazidim, 0.2 µM Cefmenoxim und 0.1 µM Cefotaxim auf die Substratsättigungskurve mit Cefazolin als Substrat wurde untersucht (Abb. 49).

Abb. 49: Einfluß von Ceftazidim, Cefmenoxim und Cefotaxim auf die Substratsättigungskurve von Cefazolin

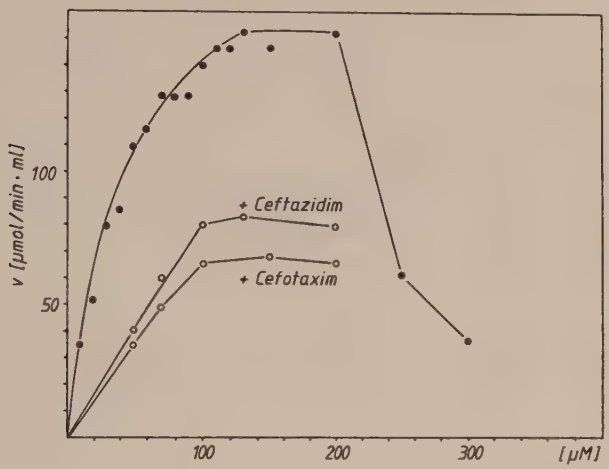


ohne Inhibitor (o), + 30 µM Ceftazidim (●), + 0.2 µM Cefmenoxim (□) + 0.1 µM Cefotaxim (■), die Kinetik wurde mit gereinigter ß-Laktamase aus E. cloacae 208 durchgeführt.

Eine Besonderheit trat mit Ceftazidim als Inhibitor auf, legte man die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in der ersten Minute zugrunde, erfolgte Aktivierung, legte man die Geschwindigkeit ab der zweiten Minute, die von hier an linear verlief, zugrunde, wurde die Enzymaktivität erheblich gehemmt. Der Bereich der Substratüberschußhemmung wurde in Gegenwart der Inhibitoren deutlich früher erreicht. Mit Ceftazidim als Inhibitor wurde die höchste Enzymaktivität bei 100 µM Cefazolin erreicht, danach trat Substrathemmung auf. In Gegenwart von Cefotaxim und Cefmenoxim erfolgte Substrathemmung ab 150 µM Cefazolin. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit 0.2 µM Cefmenoxim von 21.1 U/ml auf 14.3 U/ml, mit 0.1 µM Cefotaxim auf 15.9 U/ml und mit 30 µM Ceftazidim auf 18.1 U/ml, bzw. 8 U/ml erniedrigt. Der $V_{max}/2$-Wert für Cefazolin verringerte sich in Anwesenheit von Cefmenoxim von 68 µM auf 64 µM, mit Cefotaxim auf 55 µM und mit Ceftazidim auf 40 µM, bzw. 48 µM.
Obwohl die Dixon-Auftragung kompetitive, bzw. nicht-kompetitive Hemmung je nach verwendetem Substrat für die verschiedenen Aminothiazol-Cephalosporine aufzeigte, schien der tatsächliche Hemmechanismus keinem der beiden Typen anzugehören. Vielmehr fand sowohl Verringerung von V_{max} (wie bei nicht-kompetitiver Hemmung), als auch eine Veränderung der Bindekonstanten (wie bei kompetitiver Hemmung) statt.

Der Einfluß von 0.2 µM Cefotaxim und 30 µM Ceftazidim auf die Substratsättigungskurve von Cephalothin (Abb. 50) bewirkte ebenfalls eine Verringerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (von 150 U/ml auf 63.7 U/ml bei Anwesenheit von Cefotaxim, auf 83 U/ml bei Ceftazidim) und eine Erhöhung von $V_{max}/2$ ((mit Cefotaxim von 30 µM auf 49 µM und mit Ceftazidim auf 53 µM).

Abb. 50: Einfluß von Cefotaxim und Ceftazidim auf die Substratsättigungskurve von Cephalothin

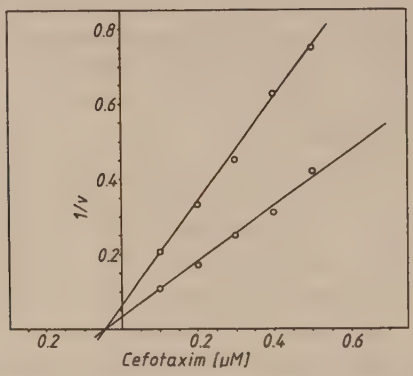


ohne Inhibitor (●), + 0.2 µM Cefotaxim, + 30 µM Ceftazidim
Die Kinetik wurde mit gereinigter ß-Laktamase aus E. cloacae 208 ausgeführt.

Vergleich der K_i- und I_{50}- Werten von Rohextrakt und gereinigter ß-Laktamase

Auch mit Rohextrakt der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 waren bereits Hemmkinetiken aufgenommen worden. Der K_i-Wert für Cefotaxim wurde mit 0.1 mM und 0.05 mM Cephalothin bestimmt, er lag bei 0.047 µM und der Hemmtyp war nicht-kompetitiv (Abb. 51), im Gegensatz dazu war der Hemmmechanismus mit gereinigter ß-Laktamase kompetitiv und der K_i höher (0.1 µM). Beim Vergleich der mit PADAC ermittelten I_{50}-Werte für Rohextrakt und angereichertem Enzym ergaben sich ebenfalls Unterschiede, die Inhibitor-Werte waren bei Verwendung von gereinigtem Enzym deutlich höher (Tabelle 45), der Vergleich der K_i- und I_{50}-Werte mit Cephalothin als Substrat und PADAC als Substrat für Cefotaxim (I_{50} mit Cephalothin als Substrat für Rohextrakt 0.05 µM, für gereinigte ß-Laktamase 0.3 µM) machte dies gleichfalls deutlich.

Abb. 51: Hemmung der Hydrolyse von Cephalothin durch Cefotaxim



Die Kinetik wurde mit Rohextrakt von E. cloacae 208 ausgeführt.

Tabelle 45: I_{50}-Werte mit PADAC als Substrat für Rohextrakt und gereinigte ß-Laktamase aus E. cloacae 208

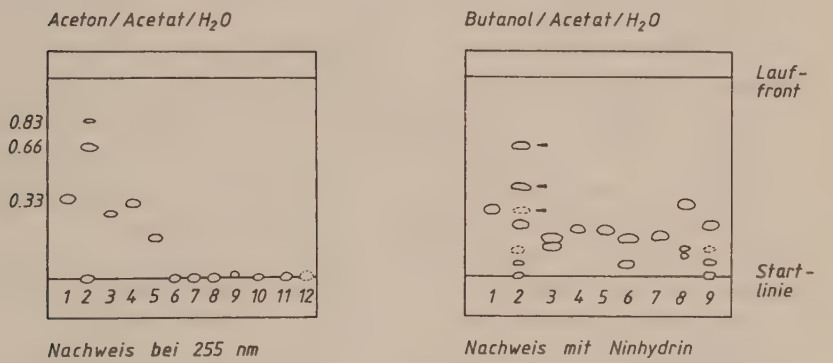
Cephalosporin	I_{50} {µM} Rohextrakt	gereinigte ß-Laktamase
Cefamandol	5.8	22
Cefotaxim	0.042	0.26
Desacetyl-CTX	8	30
Ceftizoxim	0.9	12
Cefmenoxim	0.05	0.275
Ceftriaxon	0.2	2.5
Ceftazidim	6.8	11.5

3.7. Untersuchung der Hydrolyse-Produkte von Cephalosporinen

3.7.1. Spaltprodukte von Cefotaxim

10 mM Cefotaxim wurden durch die angereicherte Cephalosporinase aus E. cloacae 208 vollständig hydrolysiert (durch Nitrocefin überprüft) und die Hydrolyseprodukte dünnschichtchromatographisch in Aceton/Acetat/H_2O (95:5:2) aufgetrennt.
Als Standard dienten intaktes Cefotaxim und als Vergleichssubstanzen Desacetyl-Cefotaxim und die aus menschlichem Urin gewonnenen Cetotaxim-Abbau-Produkte UP1 und UP2, sowie die Aminosäuren L-Alanin, L-Methionin, ß-Alanin, Homocystein, Serin und Cystein.
Bei der Hydrolyse von Cefotaxim (R_F = 0.33) entstanden zwei Spaltprodukte mit R_F-Werten von 0.66 und 0.83 (Abb. 52).

Abb. 52: Hydrolyseprodukte von Cefotaxim



1. Cefotaxim-Standard
2. hydrolysiertes Cefotaxim
3. UP1
4. UP2
5. Des-Cefotaxim
6. L-Alanin
7. L-Methionin
8. ß-Alanin
9. Homocystein
10. Serin
11. Cystein
12. Enzymstandard

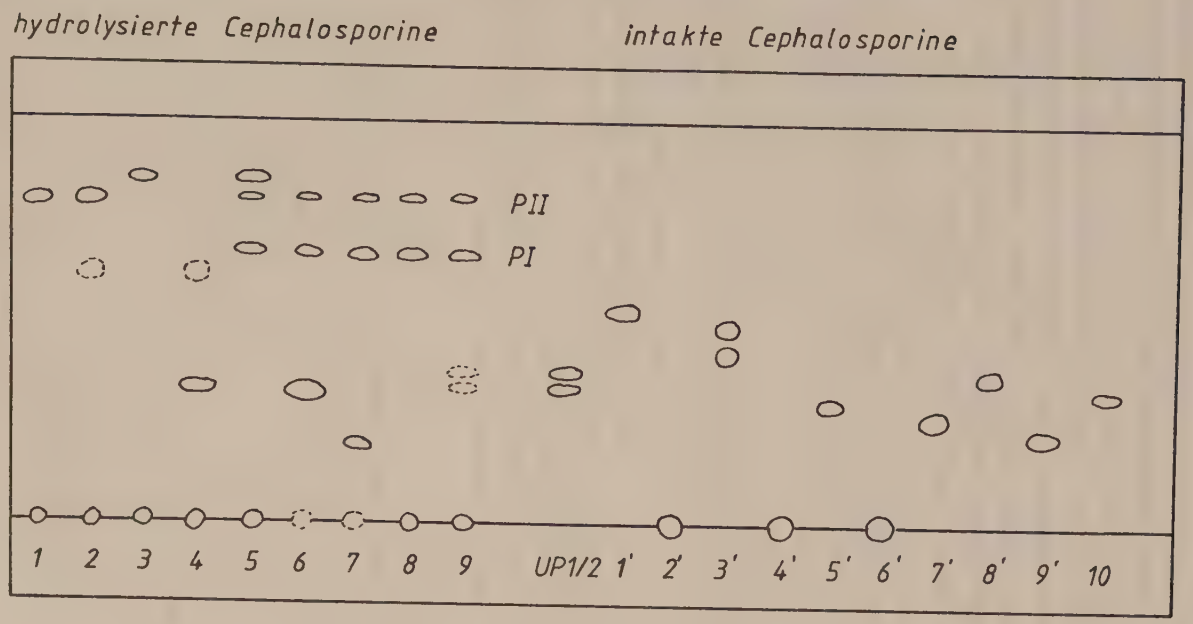
1. Cefotaxim-Standard (gelb)
2. hydrolysiertes Cefotaxim, ➖ Produktflecke
3. Homocystein (rot, violett)
4. L-Alanin (rot)
5. ß-Alanin (blau)
6. L-Cystein (rot, violett)
7. L-Serin (rot)
8. L-Methionin (rot, blau, rot)
9. Enzymstandard (rot)

Der Cefotaxim-Fleck war nach Hydrolyse vollständig verschwunden, zur Kontrolle wurde hier wie auch bei späteren Versuchen Cefotaxim ohne Enzymeinwirkung bei 37°C mitinkubiert und eventuelle Bruchstücke mitverglichen, es entstand aber lediglich in ganz geringen Mengen Desacetyl-CTX Die Hydrolyseprodukte waren nicht identisch mit den Abbauprodukten, wie sie im Urin von Mensch und Tier gefunden werden können (UP1 = R_F von 0.386, UP2 = R_F von 0.346, Desacetyl-CTX = R_F von 0.173). Die Referenz-Aminosäuren blieben auf der Startlinie liegen, da bei der Hydrolyse von Cefotaxim ebenfalls ein Fleck auf der Startlinie entstand, wurde das Hydrolysat und die Referenz-Aminosäuren in Butanol/Acetat/H_2O (60:15:25) aufgetrennt und die Produkte mit Ninhydrin sichtbar gemacht (Abb. 52).
Eine Zuordnung der Aminosäuren zu den Produkten von Cefotaxim war nicht möglich.

3.7.2. Spaltprodukte anderer Cephalosporine

Ceftazidim, Cefmenoxim, Ceftriaxon, Ceftizoxim und Desacetyl-CTX (alle 10 mM) wurden mit angereicherter ß-Laktamase aus E. cloacae 208 vollständig hydrolysiert, dünnschichtchromatographisch in Aceton/Acetat/Wasser aufgetrennt und die Flecke im UV-Licht bei 255 nm detektiert. Zum Vergleich erfolgte Hydrolyse und Auftrennung von Cephalothin, Cephaloridin, Cefamandol und Cefoperazon (alle 20 mM). Diese Cephalosporine wiesen die gleichen C_3-Substituenten wie die Aminothiazol-Cephalosporine auf. Außer bei Ceftazidim traten bei allen untersuchten Aminothiazol-Cephalosporinen die Spaltprodukte PI (R_F = 0.66) und PII (R_F = 0.83) auf (Abb. 53). Hierbei handelte es sich offenbar um den C_7-Rest, der allen gemeinsam war. Die anderen Flecke korrespondierten jeweils mit den C_3-Resten der ersten und zweite Generation Cephalosporine, die vergleichend getestet wurden, der Thiazolring des Cephaloridins hatte ebenso wie der des Cephalothins einen R_F von 0.8. Cefmenoxim wies wie Cefamandol und Cefoperazon einen Fleck mit R_F von 0.846 auf, hierbei handelte es wohl um den Methyl-tetrazol-thiomethyl-Rest, Ceftazidim wies wie Cephaloridin einen Fleck mit R_F von 0.64 auf (Pyridinrest).

Abb. 53: Hydrolyseprodukte von Aminothiazol- und anderen Cephalosporinen



1. Cephalothin
2. Cephaloridin
3. Cefamandol
4. Ceftazidim
5. Cefmenoxim
6. Ceftriaxon
7. Ceftizoxim
8. Cefotaxim
9. Desacetyl-Cefotaxim
10. Azthreonam (intakt)

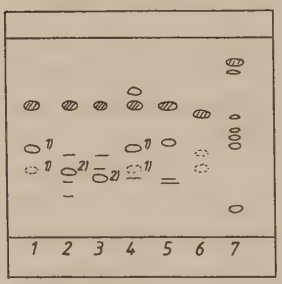
1. - 3. lagen 20 mM im Test vor und wurden 2 h inkubiert,
4. - 9. lagen 10 mM im Test vor und wurden 6 h inkubiert.

Ceftazidim, welches einen modifizierten C_7-Rest (wie Azthreonam) verglichen mit den anderen Aminothiazol-Cephalosporinen besaß, zeigte einen Fleck mit dem R_F von 0.32 und keine Spaltprodukte PI und PII.
Bei Hydrolyse von Ceftizoxim (kein C_3-Substituent) entstand ein Produkt mit R_F von 0.16, bei Desacetyl-CTX (lediglich eine Hydroxyl-Gruppe am C_3) traten ganz schwach UP1 und UP2 auf, bei Ceftriaxon konnte der dritte Fleck dem Triazinrest zugeordnet werden (R_F = 0.32).

Diese Untersuchungen wurden auch mit den gereinigten ß-Laktamasen der anderen E. cloacae-Stämme 5, 352M, 149M und P99 durchgeführt. Dabei entstanden die gleichen Spaltprodukte der jeweiligen Cephalosporine wie bei Hydrolyse durch das Enzym aus E. cloacae 208.

Wie schon für Cefotaxim, sollten auch die Hydrolyse-Produkte der anderen Cephalosporine auf das Entstehen von Aminosäuren überprüft werden. In Abb. 54 wurden die Flecke des Enzymextraktes, die ebenfalls durch Ninhydrin anfärbbar waren, der besseren Übersicht wegen weggelassen, die Aminosäurestandards sind Abb. 52 zu entnehmen.

Abb. 54: Hydrolyseprodukte von Cephalosporinen nach Chromatographie in Butanol/Acetat/Wasser



1. Cefotaxim
2. Desacetyl-Cefotaxim
3. Ceftizoxim
4. Cefmenoxim
5. Ceftriaxon
6. Ceftazidim
7. Cephalothin

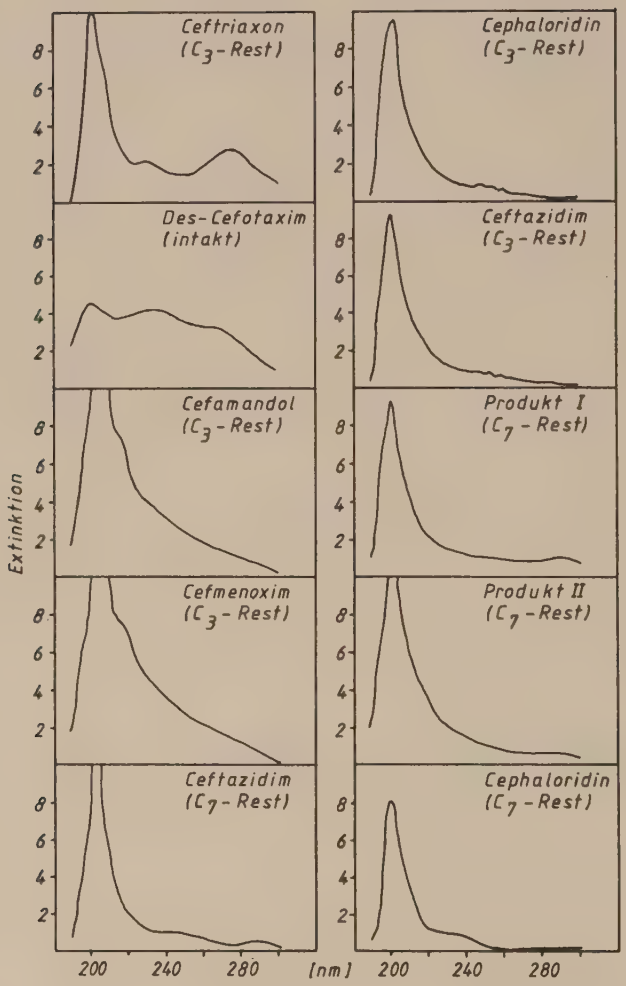
1) nicht im UV zu sehen
2) im UV nur schwach
– im UV traten neue Banden auf

Zunächst wurden die Produktflecke im UV-Licht bei 255 nm detektiert und anschließend mit Ninhydrin angefärbt.
Der dicke gelbe Fleck konnte PI und PII (R_F von 0.66) zugeordnet werden, da er außer bei Ceftazidim bei allen anderen Aminothiazol-Cephalosporinen auftrat.
Bei Cefotaxim und Cefmenoxim, sowie Desacetyl-CTX und Ceftizoxim entsprachen die blaßgelben und roten Flecke Bruchstücken des ß-Laktam- und des Dihydrothiazin - Rings, bei Cefmenoxim trat zusätzlich ein Fleck mit R_F = 0.73 auf (C_3-Rest), bei Ceftriaxon ein Fleck mit R_F = 0.46.
Der C_7-Rest von Ceftazidim war ein deutlicher gelber Fleck mit einem R_F von 0.61.
Die Flecke der C_7-Substituenten waren auch im UV-Licht gut zu erkennen und korrespondierten mit den angefärbten Flecke wie oben beschrieben. Den Aminosäurestandards konnten die Bruchstücke des ß-Laktam- und Dihydrothiazin- Rings nicht zugeordnet werden.

3.7.3. UV-Spektrum der Spaltprodukte

Zur Absicherung, daß es sich bei den Flecken nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung in Aceton/Acetat/Wasser, tatsächlich um die jeweils zugeordneten C_3- und C_7-Reste handelte, wurden UV-Spektren der einzelnen Produkte gefahren und miteinander verglichen.
Hierzu erfolgte vollständige Hydrolyse von Cephaloridin, Cefotaxim, Ceftizoxim, Cefamandol, Ceftazidim, Cefmenoxim, Ceftriaxon (alle 20 mM), Auftrennung und anschließendes Auskratzen der Flecke. Die Spektren wurden im Bereich von 300 - 190 nm aufgenommen (Abb. 55).
Der C_3-Rest von Ceftazidim war dem von Cephaloridin gleich, ebenso die Reste von Cefmenoxim und Cefamandol am C_3, die Schulter bei 220 nm war allerdings beim Produkt von Cefmenoxim ausgeprägter. Der C_7-Rest von Ceftazidim wies interessanterweise ein ähnliches Spektrum wie PI von Cefotaxim auf, der Peak bei 210 nm war jedoch ausgeprägter.
Der C_7-Rest von Cephaloridin hatte einen deutlich niedrigeren Peak bei 200/210 nm als Substanzen mit Methoxyiminogruppe (die R_F-Werte waren sehr ähnlich denen von PII, die Struktur

Abb. 55: UV-Spektren der Spaltprodukte

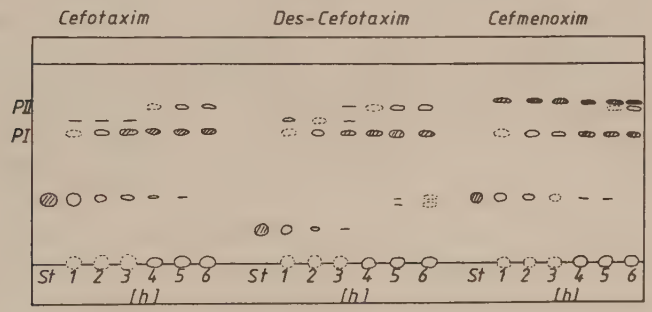


des C_7-Restes von Cephaloridin aber völlig verschieden). Der C_7-Rest von Ceftizoxim (PII) wies einen signifikant höheren Peak bei 200/210 nm als PI auf, ansonsten waren ihre Spektren sehr ähnlich. Der C_3-Rest von Ceftriaxon zeigte einen deutlichen Peak bei 280 nm, einen kleineren Peak bei 230 und einen etwas größeren Peak bei 200/210 nm.

3.7.4. Auftreten der Spaltprodukte im Verlauf der Hydrolyse

Das Auftreten der Spaltprodukte im Verlauf der Hydrolyse (9.5 h bis zum vollständigen Abbau) wurde mit Ceftriaxon, Desacetyl-Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftizoxim, Cefotaxim und Cefmenoxim untersucht. Alle Stunde wurden die Proben auf DC-Platten aufgetrennt in Aceton/Acetat/Wasser und im UV-Licht bei 255 nm die Produkte sichtbar gemacht.
In Abb. 56 sind das Auftreten der verschiedenen Hydrolyseprodukte von Cefotaxim, Desacetyl-Cefotaxim und Cefmenoxim dargestellt, bei den anderen Cephalosporinen war der zeitliche Ablauf ähnlich.

Abb. 56: Auftreten der Spaltprodukte im Verlauf der Hydrolyse von Cefotaxim, Desacetyl-Cefotaxim und Cefmenoxim



Alle Cephalosporine lagen zu Beginn der Hydrolyse 10 mM vor, es wurden je 5 µl Probe auf die DC-Platten aufgetragen.

Die Hydrolyse erfolgte durch angereicherte ß-Laktamase aus E. cloacae 208.

Aus Cefotaxim entstand zunächst PI, der Fleck wurde von Stunde zu Stunde deutlicher. Der Produktfleck auf der Startlinie wurde erst ab der 4. Stunde intensiver. Das Zwischenprodukt I (R_F = 0.73) war nach vier Stunden nicht mehr zu erkennen, ab der 3. Stunde entstand Produkt II, wurde ebenfalls immer deutlicher,aber war nicht so intensiv wie PI. Der Cefotaximfleck verschwand nach sechs Stunden vollständig. Desacetyl-Cefotaxim konnte nicht eindeutig als Zwischenprodukt beobachtet werden.
Aus Desacetyl-Cefotaxim entstand von Anfang an gut sichtbar Zwischenprodukt I, nach zwei Stunden wurde der Fleck schwächer, nach vier Stunden war er fort, gleichzeitig wurde Produkt I immer deutlicher. Nach sechs Stunden konnte ganz schwach UP1/UP2 entdeckt werden.
Aus Cefmenoxim entstand kein Zwischenprodukt I, zunächst trat PI nur schwach, der Fleck des C_3-Restes (PIII) aber ganz deutlich auf, ebenso der Fleck auf der Startlinie. Nach vier Stunden war kaum noch intaktes Cefmenoxim vorhanden, PII erschien aber erst nach fünf Stunden ganz schwach.
Bei der Hydrolyse von Ceftriaxon und Ceftazidim konnte,wie bei der von Cefmenoxim,sofort das Auftreten des jeweiligen C_3-Restes nach Beginn des enzymatischen Abbaus beobachtet werden. Auch bei Ceftizoxim erschienen die Spaltprodukte, die dem ß-Laktam- und Dihydrothiazin - Ring entstammten bald nach Beginn der Hydrolyse, während PI und PII nur langsam auftraten.

4. Diskussion

Der Resistenzmechanismus gram-negativer Bakterien gegen ß-Laktamantibiotika konnte bislang nicht zufriedenstellend geklärt werden. Schon früh wurde erkannt, daß bei ß-Laktamase-produzierenden Organismen die jeweilige ß-Laktamase eine bedeutende Rolle spielte (Abraham und Chain 1940, Richmond und Sykes 1973), aber auch Veränderungen der äußeren Bakterienmembran oder der Affinität von PBP's zu den Antibiotika mußten in Erwägung gezogen werden, da nicht alle Phänomene durch hydrolytische Inaktivierung zu erklären waren. So schien bei einigen gram-positiven Bakterien tatsächlich eine Veränderung der PBP's Ursache für Resistenz zu sein (Bruns 1980, Williamson et al. 1981), während bei Pseudomonas spp., neben der ß-Laktamase-Aktivität, die verminderte Permeabilität der äußeren Bakterienmembran einen entscheidenden Einfluß ausübte (Angus et al. 1982, Yoshimura und Nikaido 1982). Bei den Enterobakterien hingegen überwog die Bedeutung der ß-Laktamase (Sykes und Matthew 1976), obwohl auch andere Ursachen, sogenannte "intrinsic factors" vermutet wurden (Ott et al. 1979).

Eine Veränderung der PBP's oder der äußeren Membran durch Mutation konnte bei E. cloacae durch Übertragung des bla-Gens aus einem hochresistenten E. cloacae-Stamm (208) in einen sensiblen E. coli ausgeschlossen und so die alleinige Verantwortung der Cephalosporinase für Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika nachgewiesen werden (Seeberg 1983).

Der Mechanismus der Resistenz aber wurde bisher nicht vollkommen verstanden, da die Cephalosporinase moderne Cephalosporine wie Cefotaxim, Cefmenoxim und andere kaum hydrolysierte, die MHK-Werte dieser Substanzen, und somit auch die Resistenz der E. cloacae-Stämme, jedoch beachtlich hoch waren.

4.1. Charakterisierung der ß-Laktamase aus E. cloacae

Alle Bakterien produzieren, zumindest in geringen Mengen, eine chromosomale ß-Laktamase. Diese Enzyme sind laut Matthew und Harris (1976) spezifisch für Genus, Spezies und Subspezies. Sykes und Matthew (1976) bezeichneten ß-Laktamasen mit einem IP von über 7.6 (z.B. aus E. cloacae P99) als Spezies-spezifisch für E. cloacae-Stämme.
Im hiesigen Institut wurden in einer vergleichenden Studie drei chromosomal-codierte ß-Laktamasen bei E. cloacae gefunden und als E. cloacae-ß-Laktamase A (IP = 8.8), E. cloacae-ß-Laktamase B (IP = 7.8) (Seeberg et al. 1983) und E. cloacae-ß-Laktamase C (IP = 9.1) (Korfmann pers. Mitteilung) bezeichnet. Aufgrund ihres IP's von 7.8 wurden die Enzyme aus E. cloacae P99 (Richmond und Sykes 1973) und E. cloacae 55M (Gootz et al. 1982) zum Typ B gerechnet. E. cloacae GN7471 aus Japan (Minami et al. 1980) und Stämme aus England (Ross pers. Mitteilung) wiesen chromosomale ß-Laktamasen mit IP's von 8.4 auf. Diese Enzyme stellten wahrscheinlich eine weitere Gruppe dar.
Wie im Verlauf der vorliegenden Arbeit deutlich wurde, waren die chromosomal-codierten ß-Laktamasen aus E. cloacae nicht nur Spezies-, sondern trotz großer Ähnlichkeit untereinander, auch Stamm-spezifisch.

Die chromosomalen ß-Laktamasen aus vier hochresistenten E. cloacae-Stämmen wurden gereinigt und biochemisch, wie kinetisch charakterisiert. Zwei der Organismen, E. cloacae 149M und 352M, waren CTX^r-Mutanten. Sie konnten von CTX^s-Wildtypen, die eine induzierbare Cephalosporinase aufwiesen, erhalten werden (Seeberg 1983). Die beiden anderen Stämme, E. cloacae 5 und 208, waren CTX^r klinische Isolate. E. cloacae 208 und 149M besaßen eine ß-Laktamase mit einem IP von 8.8, E. cloacae 5 eine mit IP 7.8 und Stamm 352M mit einem IP von 8.0 (ursprünglich mit 7.8 bestimmt, bei genauerer Untersuchung aber als 8.0 identifiziert → B').

Die vier ß-Laktamasen aus den verschiedenen E. cloacae-Stämmen lagen nach Ultraschallaufschluß und anschließender Ultra-

zentrifugation gelöst im Überstand vor. Ein erheblicher Teil des Enzyms aber blieb an Membranen gebunden, da nach Ultrazentrifugation immerhin 15 - 40 % der Aktivität des Rohextraktes im Sediment (Membran-Fraktion) verblieben. Offensichtlich war die ß-Laktamase locker mit der Cytoplasmamembran assoziiert und wurde durch Ultrabeschallung abgelöst. Eine Bindung an die innere Membran wäre auch eine Erklärung für die erheblich schlechtere Ausbeute mit anderen Aufschlußmethoden, wie "Lysozym und EDTA", "osmotic shock", "freeze and thaw" oder Toluol- und Phenylamin-Behandlung (Neu und Winshell 1972, Simpson und James 1982). Als epimeres Protein würde die ß-Laktamase nicht, wie bisher angenommen (Sanders 1983), frei im periplasmatischen Raum vorkommen.

In nur drei Schritten konnten die Enzyme bis zur Homogenität gereinigt werden. Die SDS-Gelelektrophorese ergab für die ß-Laktamasen aus E. cloacae 149M und 352M Molekulargewichte von 39 000, für die ß-Laktamase aus Stamm 5 von 38 000 und aus Stamm 208 von nur 35 000. Diese Unterschiede waren signifikant und nicht auf Meßschwankungen zurückzuführen. Bei den vorliegenden Cephalosporinasen handelte es sich um Monomere, da bereits anhand der S 300-Chromatographie ein Molekulargewicht zwischen 30 000 und 40 000 ermittelt worden war.

Die vier ß-Laktamasen waren typische Cephalosporinasen. Sie zeigten sowohl untereinander, als auch im Vergleich mit bereits beschriebenen Cephalosporinasen aus E. cloacae (Minami et al. 1980, Ross und Boulton 1973) und der chromosomalcodierten Cephalosporinase aus C. freundii (Tajima et al. 1980) große Ähnlichkeit (Tabelle 46). Die älteren Cephalosporine (z.B. Cephaloridin) wurden mit sehr hoher Aktivität hydrolysiert, Aminothiazol-Cephalosporine (z.B. Cefotaxim) hingegen nur langsam inaktiviert. Von den Penicillinen wurden Penicillin G oder Azlocillin deutlich schlechter abgebaut als Cephaloridin, aber besser als Cefmenoxim oder Cefotaxim. Die Aminothiazol-Cephalosporine, ebenso Azthreonam und Latamoxef konnten zwar (entgegen der Bezeichnung "Hydrolyse-

stabil") abgebaut werden, aber die Enzymaktivität war relativ gering (Wiedemann und Tolxdorff-Neutzling 1983).

Tabelle 46: Vergleich der E. cloacae-ß-Laktamasen mit Cephalosporinasen anderer gram-negativer Organismen

Organismus	IP	Molekulargewicht	pH Optimum	Temp.	Hemmung d. pCMB
E. cloacae 208	8.8	35 000	8.0	40°C	-
" 352M	8.0	39 000	8.0	40	-
" P99	7.8	49 000	8.2	40	-
" GN7471	8.4	44 000	8.5	40	-
C. freundii GN7391	8.6	38 000	8.0	45	-
S. marcescens	9.6	37 000	8.5	n.b.	-
P. rettgeri	8.7	42 000	8.0	50	+
P. vulgaris	8.8	29 000	7.0	45	n.b.
P. morganii	7.2	~40 000	8.5	50	n.b.
E. coli 984	7.2	39 000	8.4	n.b.	n.b.
P. cepacia GN11164	9.3	~23 000	8.0	45	+

n.b. = nicht bestimmt

Viele andere Enterobakterien produzierten ebenfalls chromosomale Cephalosporinasen, zum Teil induzierbar, nach Mutation oft auch konstitutiv (Fujii-Kuriyama et al. 1977, Tajima et al. 1981, Matsubara et al. 1981, Okonogi et al. 1981). Bei pH- und Temperatur-Optimum, Molekulargewicht oder Hemmbarkeit durch pCMB trat weitgehend Übereinstimmung mit den ß-Laktamasen aus E. cloacae und C. freundii auf (Tabelle 46). Die Enzyme aus P. vulgaris, E. coli 984 (Seibert und Limbert 1982), sowie P. cepacia (Hirai et al 1980) unterschieden sich von den übrigen durch ihre Fähigkeit Aminothiazol-Cephalosporine zu hydrolysieren. Die ß-Laktamase aus P. rettgeri (Matsuura et al. 1980) wurde im Gegensatz zu den anderen durch 0.1 mM pCMB fast vollständig gehemmt, ein Hinweis auf das Vorhandensein von SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms.

Ambler (1980) teilte ß-Laktamasen anhand ihrer Aminosäuresequenz in zwei Gruppen, A und B ein. Unter A faßte er Enzyme, wie die Penicillinasen aus B. licheniformis, B. cereus (ß-Laktamase I), E. coli R6K (mit TEM-1) und S. aureus mit einem Serinrest im aktiven Zentrum zusammen. Sie alle waren nicht durch pCMB hemmbar. Unter B befanden sich Metalloenzyme, die Zn^{++} als prosthetische Gruppe benötigten. An der Bindung des Metallions waren Histidin- und Cysteinreste beteiligt. Die enzymatische Reaktion konnte durch SH-Gruppenreagenzien gehemmt werden (ß-Laktamase II aus B. cereus).

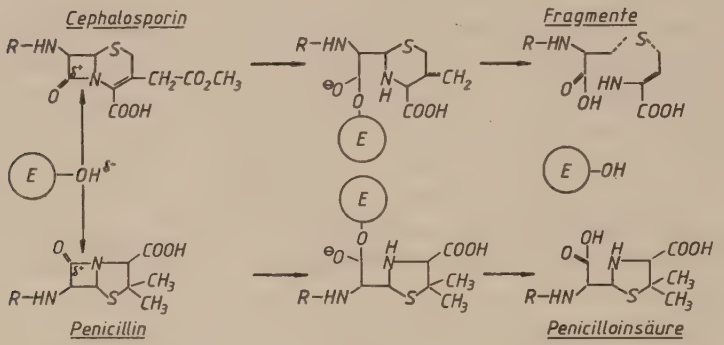
Jaurin und Grundström (1981) postulierten aufgrund von Sequenzuntersuchungen des ampC-ß-Laktamase Gens des E. coli K12 Chromosoms eine weitere Gruppe (C) von ß-Laktamasen. Diese ß-Laktamase aus E. coli hydrolysierte vor allem Cephalosporine und wies in ihrem aktiven Zentrum einen Serinrest auf. Sie war nicht homolog mit den Serinpenicillinasen der Gruppe A. Vielmehr hatte ihr aktives Zentrum eine große Homologie zu der chromosomalen Cephalosporinase aus P. aeruginosa (Knott-Hunziker et al. 1980). Bergström et al. (1982) zeigten, daß die Gene der chromosomal-codierten Cephalosporinasen vieler Enterobakterien (S. flexneri, S. marcescens u.a.) Sequenzhomologie mit dem ampC-Gen von E. coli K12 aufwiesen.

Für die Cephalosporinase aus E. cloacae konnte wegen der großen Ähnlichkeit, in biochemischer (Tabelle 46) und kinetischer Hinsicht (Tabelle 47), mit anderen Serincephalosporinasen, vor allem aber auch aufgrund der fehlenden Hemmbarkeit duch SH-Gruppenreagenzien, ebenfalls die Beteiligung eines Serinrestes am katalytischen Geschehen angenommen werden. Eine Sequenzierung des chromosomalen bla-Gens von E. cloacae, oder eine Analyse der Aminosäuresequenz dieser ß-Laktamase wurde noch nicht durchgeführt.

Bei Serinenzymen aus P. aeruginosa (Sabath et al. 1965) und E. coli (Datta und Richmond 1966) konnte als Schlüsselreaktion zwischen Enzym und Substrat die Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes nachgewiesen werden (Knott-Hunziker et al. 1980, Fisher et al. 1980). Hierbei übernahm die Hydroxy-

gruppe des Serins im aktiven Zentrum die Funktion eines Nukleophils bei der Katalyse. Das teilpositivierte C-Atom der Carbonylgruppe des ß-Laktamrings wurde angegriffen, der Ring geöffnet und eine Acylverbindung hergestellt (Abb. 57). Der Acyl-Enzym-Komplex aber war im allgemeinen nicht stabil, rasch folgte Deacylierung, wobei die Esterbindung hydrolytisch gespalten und das aktive Enzym wieder regeneriert wurde.

Abb. 57: Mechanismus der Spaltung des ß-Laktamrings durch eine Serin-ß-Laktamase



Die Hydrolyse von Cephalosporinen erfolgte in sehr ähnlicher Weise, im Gegensatz zur Spaltung von Penicillinen aber entstand bei Cephalosporinen keine Cephalosporoinsäure, sondern eine Vielzahl von Bruchstücken (O'Callaghan und Muggleton 1963, Hamilton-Miller et al 1970). Eine Ausnahme bildeten Cephalosporine mit einem Substituenten in 3-Stellung, der ein konjugiertes System an Doppelbindungen aufwies, wie z.B. das 2,4-Dinitrostyrol des Nitrocefins (Sykes und Matthew 1976), hier entstand bei Hydrolyse die entsprechende Säure, ein weiterer Zerfall unterblieb.

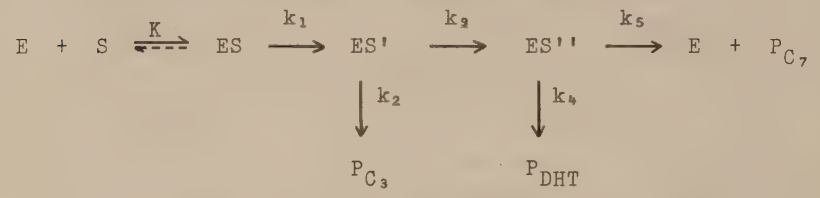
Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cephalosporinasen wurde ein Reaktionsmechanismus, ähnlich dem der zuvor be-

schriebenen Serin-Enzymen angenommen. Vermutlich griff auch hier ein aktiver Serinrest den ß-Laktamring der jeweiligen Cephalosporine und Penicilline an.
Die vier E. cloacae Cephalosporinasen wiesen Unterschiede in der spezifischen Aktivität mit den verwendeten Cephalosporinen auf. Das Enzym aus E. cloacae 208 zeichnete sich durch besonders hohen Umsatz von zweite und dritte Generation Cephalosporinen, verglichen mit den anderen ß-Laktamasen, aus. Auch Cephalothin wurde signifikant schneller abgebaut.
Die ß-Laktamase aus E. cloacae 5 fiel durch besonders geringe Hydrolyseraten auf. Die Cephalosporinase aus Stamm 352M inaktivierte Cephalosporine mit einem Pyridinrest (Cephaloridin, HR810) schneller als die anderen ß-Laktamasen. Alle vier Cephalosporinasen hydrolysierten Desacetyl-Cefotaxim, das am C_3 nur eine Hydroxymethylgruppe, und Ceftizoxim, welches keine C_3-Seitenkette aufwies, sehr viel rascher als die übrigen Aminothiazol-Cephalosporine. Die ß-Laktamase aus E. cloacae P99 wurde vergleichend mituntersucht. Sie verhielt sich, bezüglich hydrolytischer Aktivität und Affinität, wie die anderen ß-Laktamasen aus E. cloacae.

Obwohl die vier ß-Laktamasen verschiedene IP's und Molekulargewichte hatten und auch in der Enzymaktivität, wie -affinität Unterschiede auftraten, konnte anhand der Verdauung durch eine Peptidase, sowie Vergleich der Bruchstücke, eine grundsätzliche Ähnlichkeit gefunden werden. Wahrscheinlich war die Primärstruktur gleich oder nur geringfügig verschieden (kleineres Molekulargewicht), während die unterschiedliche Gestaltung der Tertiärstruktur die voneinander abweichenden IP's bedingt haben könnte. Im "peptide mapping" war nur relativ wenig ß-Laktamase aus der S 300-Chromatographie verwendet worden. Für eine wirklich eindeutige und vor allem sehr genaue Analyse müßten größere Enzymmengen und weitere zusätzliche Peptidasen eingesetzt werden.
So läßt sich lediglich festhalten, daß eine Stammspezifität der ß-Laktamasen vorlag, die Grundstruktur aber mit großer Wahrscheinlichkeit gleich war.

Die Spaltprodukte, die bei der Hydrolyse verschiedener Cephalosporine auftraten, wurden untersucht. Ihr Erscheinen im Verlauf der Hydrolyse ließ die Vermutung zu, daß, parallel zum nukleophilen Angriff an der Carbonylgruppe des ß-Laktamrings, die C_3-Seitenkette gebunden und abgespalten wurde, wobei der Rest in 3-Stellung als "leaving-group" fungierte. Wahrscheinlich erfolgte erst nach seiner Freisetzung eine Fragmentierung des Dihydrothiazinrings mit anschließender Deacylierung des Enzym-Substrat-Komplexes durch andere Gruppen im katalytischen Zentrum (Abb. 58).

Abb. 58: Hypothetisches Schema der Hydrolyse von Cephalosporinen durch die ß-Laktamasen von E. cloacae



C_3 = Rest in 3-Stellung K = Bindekonstante
C_7 = Rest in 7-Stellung k_1 - k_5 = Geschwindigkeitskonstanten
DHT = Dihydrothiazinring

Hierfür sprach das rasche Auftreten des C_3-Restes nach Beginn der Hydrolyse von Aminothiazol-Cephalosporinen. Die Substituenten in 3-Stellung von Cefmenoxim, Ceftazidim und Ceftriaxon konnten dünnschichtchromatographisch im Vergleich mit Cephalosporinen gleicher Seitenkette (Cefamandol, Cephaloridin) und anhand ihres UV-Spektrums identifiziert werden. Der für alle dritte Generation Cephalosporine mit Aminothiazoyl-Rest und Methoxyiminogruppe charakteristische Produktfleck PI mit einem R_F von 0.66 entstand sehr viel langsamer. Aminosäuren konnten als Hydrolyseprodukte nicht nachgewiesen werden, wohl aber Bruchstücke, die wahrscheinlich dem Dihydrothiazinring entstammten. Auch hier sprach das zeitlich spätere Auftreten für einen schrittweisen Zerfall der Moleküle. Möglicherweise traf das obige Hydrolyseschema

auch auf gut hydrolysierbare Cephalosporine (Cephaloridin und andere) zu, nur daß in diesem Fall die C_7-Seitenkette rascher freigesetzt werden konnte.
Ein Hinweis auf verschiedene an der Katalyse beteiligte funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum von Cephalosporinasen war die Entstehung der Säure bei Hydrolyse von Nitrocefin, eine weitere Fragmentierung fand nicht statt. Dies könnte auf fehlender Bindung des sehr großen und durch konjugierte Doppelbindungen resonanzstabilisierten C_3-Substituenten beruhen.
Im Verlauf der Hydrolyse von Cefotaxim und Desacetyl-Cefotaxim trat ein Zwischenprodukt (ZI) mit einem R_F von 0.73 auf, bei Ausbildung des zweiten Produktflecks PII mit einem R_F von 0.83 verschwand ZI wieder. Aus Cefmenoxim, Ceftriaxon und Ceftizoxim entstand bei Hydrolyse ebenfalls PII, aber kein Zwischenprodukt. Ceftazidim, welches eine modifizierte C_7-Seitenkette hatte, bildete neben dem Pyridinrest einen Produktfleck mit einem R_F von 0.32, PI und PII traten nicht auf. Ceftizoxim, das keine Seitenkette in 3-Stellung aufwies, bildete einen zusätzlichen Produktfleck (R_F = 0.16). Dieses Spaltprodukt entstammte wahrscheinlich dem Dihydrothiazinring.
Bei der Untersuchung des Abbaus von Cefotaxim im Körper von Mensch, Hund und Ratte (Chamberlain et al. 1980) fand sich als Stoffwechselprodukt Desacetyl-Cefotaxim. Hieraus entstand leicht die Lactonform, welche von Enzymen der Leber in die stereoisomeren Produkte UP1 und UP2 umgewandelt wurde. Bei der hydrolytischen Inaktivierung von Cefotaxim durch die E. cloacae Cephalosporinase hingegen konnte kein Desacetyl-Cefotaxim als Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Die Produkte PI und PII waren nicht identisch mit UP1 oder UP2. Die Struktur von PI und PII wurde noch nicht aufgeklärt. Sie entstammten aber mit Sicherheit der C_7-Seitenkette kette. Aus Desacetyl-Cefotaxim entstand bei Hydrolyse durch die ß-Laktamase ebenfalls PI und PII. In ganz geringen Mengen konnten zusätzlich UP1 und UP2 nachgewiesen werden.
Eventuell lag ein gewisser Teil der Substanz in der Lacton-

form vor. Diese konnte dann von der Cephalosporinase in UP1 und UP2 umgewandelt werden. Chamberlain et al. (1980) beschrieben ebenfalls, daß durch Einwirkung einer ß-Laktamase aus der Lactonform des Desacetyl-Cefotaxims das Spaltprodukt UP1 entstand.

Eine deutliche Strukturabhängigkeit zeigte sich bei der Affinität der verschiedenen Cephalosporine zu den E. cloacae ß-Laktamasen, gemessen als 50 %ige Hemmung der Hydrolyse von 0.06 mM PADAC. Erste Generation Cephalosporine, wie Cephaloridin und Cefazolin, hatten eine geringe Affinität zu den ß-Laktamasen (I_{50} = 155 - 400 µg/ml), nur Cephalothin hemmte bereits bei 20 - 46 µg/ml die Reaktion zu 50 %. Unter den zweite Generation Cephalosporinen wies Cefotiam eine dem Cephalothin vergleichbare Affinität auf. Die Einführung einer Aldehydgruppe in die C_7-Seitenkette bei Cefamandol und einer Methoxygruppe in 7-Stellung bei Cefoxitin bewirkten eine signifikante Erhöhung der Affinität (0.6 - 4.2 µg/ml, bzw. 0.04 - 0.36 µg/ml). Mit der Affinitätssteigerung ging eine Herabsetzung der Hydrolysegeschwindigkeit einher. Die dritte Generation Cephalosporine, wie Cefotaxim, Cefmenoxim und Ceftriaxon, mit Aminothiazolring und Methoxyiminogruppe im C_7-Substituenten, hatten die höchste Affinität zu den Cephalosporinasen (0.008 - 0.075 µg/ml). Das Cephamycin Latamoxef unterschied sich strukturell von den anderen modernen Cephalosporinen, seine hohe Affinität beruhte wahrscheinlich vor allem auf der Methoxygruppe in 7-Stellung und dem Austausch des Schwefels im sechsgliedrigen Ring gegen Sauerstoff, hierdurch wurde das Molekül reaktiver (Yoshida 1981). Der C_3-Rest übte ebenfalls einen entscheidenden Einfluß auf das Bindevermögen der jeweiligen Cephalosporine aus. Desacetyl-Cefotaxim und Ceftizoxim, die keinen, bzw. nur einen Hydroxymethylrest in 3-Stellung trugen, hatten eine geringere Affinität (0.15 - 0.9 µg/ml). Ceftazidim (I_{50} = 0.85 - 4.5 µg/ml), HR810 (13 - 40 µg/ml) und BMY28142 (23 - 542 µg/ml) zeigten die niedrigste Affinität unter den Aminothiazol-Cephalosporinen. Alle drei wiesen am C_3 einen Substituenten auf, bei dem über den Stickstoff ein Pyridin-

bzw.ein Pyrrolidinrest gebunden war, der dem Molekül eine zusätzliche positive Ladung verlieh.
Die ß-Laktamase aus E. cloacae 208 unterschied sich von den übrigen ß-Laktamasen durch insgesamt geringere Affinität zu den meisten Cephalosporinen,vor allem aber zu BMY28142.
Bei vielen der untersuchten Cephalosporinen schien ein Zusammenhang zwischen Affinität und Hydrolysierbarkeit zu bestehen. Die erste Generation (z.B. Cephaloridin) hatte zwar eine schlechte Affinität zur ß-Laktamase, wurde aber mit hoher Aktivität hydrolysiert, während zweite und vor allem dritte Generation Cephalosporine (z.B. Cefotaxim) eine intensive Affinität aufwiesen und nur langsam inaktiviert werden konnten. Desacetyl-Cefotaxim, Ceftizoxim und HR810 mit geringerer Affinität als andere moderne Cephalosporine wurden etwas besser durch die E. cloacae-ß-Laktamasen hydrolysiert. Lediglich bei Ceftazidim und BMY28142 konnte diese Beziehung nicht gefunden werden, trotz niedrigerer Affinität erfolgte ihre Inaktivierung genauso langsam wie die von Cefotaxim.

Cephalosporine hatten aufgrund der Resonanzstabilisierung des Dihydrothiazinrings eine chemisch weniger reaktive ß-Laktambindung als andere bizyklische ß-Laktamantibiotika, wie Penicilline und Monobactame (Dürckheimer 1982). Die Affinität zu den ß-Laktamasen und zu den PBP's konnte durch die Art der Substituenten, aber auch durch die räumliche Struktur gesteigert werden. Schon bei Cefoxitin und anderen zweite Generation Cephalosporine wurde durch Modifikation des C_7-Substituenten eine verbesserte Bindefähigkeit erreicht (Nozaki et al. 1979, Stapley und Birnbaum 1981, Christensen 1981). Die hohe Affinität von Cefotaxim und vergleichbaren Cephalosporinen beruhte zum einen auf der 7-Acyl-Seitenkette (Kamimura et al. 1979, Yoshida et al. 1980, Murakami und Yoshida 1981, Dürckheimer et al. 1981, Dunn 1982), entscheidender Einfluß auf Bindung und Hydrolyse durch ß-Laktamasen ging aber auch von der Natur der C_3-Seitenkette aus.
Ein Ringsystem mit einem positiv geladenen Stickstoff (HR810, BMY28142 und Ceftazidim) verminderte die Gesamt-Affinität

des Moleküls zu den E. cloacae-ß-Laktamasen deutlich, während Acetoxyreste (Cephalothin, Cefotaxim) und Methyltetrazolreste (Cefamandol, Cefmenoxim) die Affinität steigerten.

Durch Röntgenstrukturanalysen von Cefotaxim und Cefmenoxim wurde festgestellt, daß ihr ß-Laktamgerüst weder in den Atomabständen, noch in der Geometrie von anderen Cephalosporinen sehr verschieden war. ß-Laktamring und Methoxyiminogruppe waren räumlich soweit voneinander entfernt, daß keine Abschirmung des ß-Laktamrings erfolgen konnte (Dürckheimer 1982, Laurent et al. 1982).
Die relative ß-Laktamase-Stabilität der modernen Cephalosporine beruhte also nicht auf Schutz des ß-Laktamrings vor Spaltung, im Gegenteil, durch die hohe Affinität der Antibiotika fand rasche Bindung an die Cephalosporinasen der untersuchten E. cloacae-Stämme statt. Vor allem bei Cefoxitin und Latamoxef ließ sich eine Labilisierung der Laktambindung durch die elektronenziehende Wirkung der Methoxygruppe (negativer induktiver Effekt) in 7α-Stellung erklären. Wahrscheinlich wurde der Acylierungsschritt durch die verstärkte Positivierung des Laktamcarbonyls erleichtert. Die Regeneration des aktiven Enzyms aber ging, vielleicht aufgrund sterischer Behinderung oder Konformationsänderung im aktiven Zentrum durch die C_7-Seitenkette, viel langsamer vonstatten.

Obwohl die Cephalosporinasen aus E. cloacae monomere Enzyme waren, wiesen sie von der Michaelis-Menten-Kinetik abweichende Substratsättigungskurven auf. Vor allem mit Cefazolin und Cephaloridin als Substrat wurden ausgeprägtes kooperatives Sättigungsverhalten und nicht-lineare Lineweaver-Burk-Plots beobachtet. Anhand der doppelt-reziproken Auftragung und dem Hanes-Plot wurden für Cefotiam und Cephacetril ebenfalls nicht-hyperbolische Sättigungskurven nachgewiesen. Lediglich Cephalothin und Cefamandol als Substrat zeigten annähernd hyperbolischen Kurvenverlauf. Der Hill-Koeffizient, ein Maß für Kooperativität, betrug für Cephaloridin 1.8/2.0 und für Cephalothin 1.3/1.6. So folgte die Hydrolyse von Cephalothin nur scheinbar einer Michaelis-Menten-Kinetik. Wie mit den anderen Substraten lag offensichtlich auch in diesem Fall

eine Reaktion höherer Ordnung vor. Die graphisch durch Lineweaver-Burk- und Hanes-Auftragung ermittelten apparenten K_s-Werte befanden sich zumeist im Bereich von 300 µM, hier trat im enzymatischen Test bereits Substratüberschußhemmung auf. Die direkt aus der Sättigungskurve erhaltenen $V_{max}/2$-Werte waren deutlich niedriger (um 50 µM).

Solche ungewöhnlichen Sättigungskinetiken sind schon bei einigen Penicillinasen (Citri 1966) beobachtet worden. So wurden für die ß-Laktamasen aus Bacillus spp. Flexibilität der tertiären Struktur als Ursache vermutet, da keine Stabilisierung aufgrund kovalenter Bindungen (Disulfid-Brücken) erfolgte. Durch Untersuchung der optischen Drehbarkeit und Antigen-Eigenschaften dieser ß-Laktamasen konnte eine Substrat-induzierte Konformationsänderung nachgewiesen werden. Offenbar handelte es sich um einen ähnlichen Mechanismus, wie er von Koshland in der "induced fit"-Theorie für Enzym-Substrat-Interaktion beschrieben wurde (Bisswanger 1979). Auch bei der chromosomalen Cephalosporinase aus P.aeruginosa trat von der Michaelis-Menten-Kinetik abweichendes Sättigungsverhalten und Substrat-induzierte Konformationsänderung auf (Furth 1979). In diesem Fall wurde ein hysteretisches Enzymkonzept vermutet, bei welchem eine langsame, durch Substrat verursachte, Konformationsänderung schließlich zu einem weniger effektiven Enzym führte. Tatsächlich konnte für die Serinpenicillinase TEM-1 hysteretische Enzymreaktion mit Clavulansäure als Substrat beobachtet werden (Fisher et al. 1978, Charnas et al. 1978).
Neben der hysteretischen Theorie (Frieden 1970) sind noch andere Modelle zur Erklärung sigmoider und kooperativer Phänomene bei monomeren Enzymen entwickelt worden (Ainslie et al. 1972, Ricard et al. 1974, Rübsamen et al. 1974). Sie lassen sich zusammenfassen in dem "slow-transition"-Modell (Bisswanger 1979). Das abweichende Sättigungsverhalten wurde hier durch das Vorkommen des Enzyms in zwei Zuständen, einem katalytisch aktiveren und einem inaktiveren erklärt. Das Enzym lag normalerweise in der inaktiveren Form , weil thermodynamisch günstiger, vor, konnte aber durch Bindung

eines geeigneten Substrats in die aktivere Form überführt werden. Nach Ablösung des Substrats kehrte das Enzym nur langsam in den inaktiveren Zustand zurück. Bei Substratsättigung waren jedoch so viele Substratmoleküle zugegen, daß sehr rasch eine neues gebunden werden konnte und das Enzym somit in der aktiveren Form verblieb. Hierdurch erfolgte mit steigender Substratkonzentration eine Aktivierung des Enzyms und eine Anreicherung der reaktiveren Form. Bei Hemmung durch Substratüberschuß trat der entgegengesetzte Fall ein, die inaktivere Form wurde angehäuft.

Möglicherweise lag dem katalytischen Verhalten der E. cloacae-ß-Laktamasen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde. Die Hemmkinetiken mit der Cephalosporinase aus E. cloacae 208 deuteten ebenfalls auf ein komplexes Geschehen bei Bindung und Hydrolyse der untersuchten Cephalosporine hin. So wirkten Cefotaxim, Cefmenoxim, Ceftazidim und Ceftizoxim in Abhängigkeit vom Substrat als kompetitive (Cephalothin, Cefazolin, Cefotiam) oder als nicht-kompetitive Inhibitoren (Cephaloridin).
Die Hemmkinetik von Azthreonam konnte nicht eindeutig bestimmt werden. In den ersten 30 Sekunden der Enzymreaktion wirkte es als unkompetitiver Inhibitor, im Verlauf der weiteren Hydrolyse des jeweiligen Substrats als nicht-, bzw. kompetitiver Inhibitor, d.h. die Hemmung verstärkte sich während der Reaktion. Ceftazidim, welches am C_3 einen Pyridinrest trägt, zeigte nur mit Cephaloridin als Substrat, das den gleichen Rest in 3-Stellung hatte, lineare Dixon-Plots. Mit allen anderen Substraten mußten die K_i-Werte extrapoliert werden.
Die Enzymreaktion mit Cefazolin als Substrat wurde in Gegenwart geringer Cefotaxim-, Cefmenoxim- und Ceftazidimkonzentrationen intensiv aktiviert, was ebenfalls für verschiedene Enzymkonformationen und verschiedene Bindestellen sprach.
Die Affinität der Cephalosporine zur gereinigten ß-Laktamase war zum Teil deutlich niedriger als zum Enzym im Rohextrakt, während sich das Verhältnis der Enzymaktivität zwischen den verschiedenen Cephalosporinen nicht veränderte. Auch der Hemmtyp von Cefotaxim mit Cephalothin als Substrat änderte sich nach der Reinigung, vorher war er nicht-kompetitiv,

hinterher kompetitiv. Möglicherweise hatte bei der Reinigung eine Veränderung der Konformation stattgefunden, die aber nicht zu Lasten der Aktivität ging, oder der Wegfall des membrangebundenen Enzymanteils bei gereinigtem Enzym bewirkte die verringerte Affinität. Durch Bindung an die Cytoplasmamembran und sei sie noch so locker, konnte die ß-Laktamase vielleicht in einer für die Katalyse günstigeren Konformation gehalten werden, sodaß die Affinitätsmessungen mit Rohextrakt eher den natürlichen Bedingungen entsprachen. An dieser Stelle sei auch auf die weitaus höhere Abbaugeschwindigkeit von Cephaloridin, Cephalothin und Cefotiam durch ganzen Zellen hingewiesen. Offensichtlich trat unter diesen Bedingungen keine Hemmung im Bereich sehr hoher Substratkonzentrationen auf.
Die K_s- und K_i-Werte der gereinigten E. cloacae-ß-Laktamasen waren in Übereinstimmung mit den Werten für andere Cephalosporinasen aus den verschiedensten Enterobakterien (Tabelle 47).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in dieser Arbeit untersuchten Cephalosporinasen den in der Literatur beschriebenen aus E. cloacae und C. freundii recht ähnlich waren, wenn auch ganz typische Stamm-spezifische Unterschiede auftreten. Sie gehören wie eine Reihe anderer Cephalosporinasen aus den verschiedensten Spezies wahrscheinlich zum C-Typ (Serin-Cephalosporinasen, Sykes 1982), während die in mancher Hinsicht ähnlichen Enzyme aus P. vulgaris und P. cepacia, die aber durch pCMB hemmbar sind und Cefotaxim u.a. hydrolysieren können, wohl eine weitere Gruppe von ß-Laktamasen bilden. Immunologische Untersuchungen der Cephalosporinase aus P. cepacia deuten auf eine enge Verwandschaft zu der ß-Laktamase aus P. vulgaris. Kreuzreaktion zu den Cephalosporinasen aus E. cloacae, C. freundii, S. marcescens, P. aeruginosa und anderen konnte dagegen nicht beobachtet werden (Hirai et al. 1981).
Der Mechanismus der Bindung und der Hydrolyse verlief bei den E. cloacae-ß-Laktamasen sehr kompliziert. Hier schien ein Reaktionsmechanismus vorzuliegen, wie er schon für

Tabelle 47: K_s- und K_i-Werte der Cephalosporinasen verschiedener gram-negativer Organismen

Organismen	K_s-Werte (µM) der ß-Laktamasen					K_i-Werte (µM)	
	Cephaloridin	Cefazolin	Cephalothin	Cefotiam	Cefamandol	Cefotaxim	Ceftizoxim
E. cloacae 208	334	666	53	118	10.3	0.1*	4*
" 5	250	714	31	26	7.6	n.b.	n.b.
" P99	258	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
" GN7471	570	800	105	100	6	0.05*	1.15*
C. freundii	72	254	9	n.b.	n.b.	0.008**	0.036**
P. rettgeri	400	150	125	48	24	2.07*	n.b.
S. marcescens	267	571	56	17	174	1.1**	7.7**
P. morganii	84	2.8	5.9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
P. vulgaris	n.b.	54.1	56.2	n.b.	n.b.	222***	n.b.
E. coli 984	220	23	n.b.	22	n.b.	210***	n.b.
P. cepacia	70.4	40	71.4	133.3	181.8	250***	n.n.

n.b. = nicht bestimmt

* mit 0.1 mM Cephalothin als Substrat

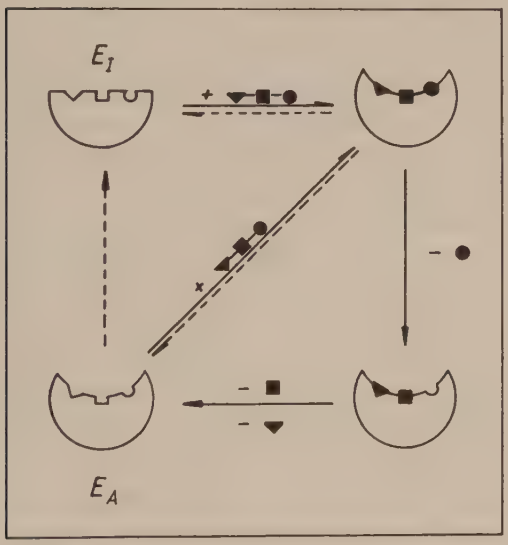
** mit 0.1 mM Cephaloridin als Substrat

*** K_s-Wert

Die Werte wurden zum Teil der Literatur entnommen (Ross und Boulton 1973, Fujii-Kuriyama et al. 1977, Tajima et al. 1980, Minami et al. 1980, Tajima et al. 1981, Matsubara et al. 1981, Okonogi et al. 1981, Hirai et al 1980, Matsuura et al. 1980 und Seibert und Limbert 1982).

andere monomere Enzyme beschrieben worden ist, die auch nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten.
Offensichtlich induzierten die verschiedenen Cephalosporine je nach molekularer Struktur eine für Umsatz und Bindung weiterer Moleküle günstigere Konformation (Abb. 59).

Abb. 59: Hypothetisches Schema der Substrat-induzierten Konformationsänderung und daraus resultierendem kooperativen Sättigungsverhalten der ß-Laktamasen aus E. cloacae



Das Enzym liegt vor allem in der inaktiveren Form (E_I) vor, E_I bindet schlechter, nach Ablösung des Substrats befindet sich das Enzym im Zustand E_A und geht langsam wieder in E_I über.

Hierbei spielte sowohl die Natur des C_7-, als auch die des C_3-Substituenten und die Reaktivität der ß-Laktambindung eine entscheidende Rolle.
Bei kinetischen Modelluntersuchungen mit PBP's fanden Ghuysen et al. (1979), daß bestimmmte 7-Acylreste von Cephalosporinen eine zweite Bindestelle im Targetenzym schufen, und so eine

beschleunigte Bildung des Acyl-Enzymkomplexes erfolgte.
Bei einer typischen Hydrolase mit einem Serinrest im aktiven Zentrum, Chymotrypsin A (sie spaltete vor allem aromatische Aminosäuren), konnte ebenfalls eine Vielzahl weiterer Bindestellen nachgewiesen werden (Gray 1971).
Bei PBP's mit aktivem Serinrest wurden drei Enzymbindestellen im aktiven Zentrum gefunden (Ghuysen et al. 1983) und die Untersuchung zu Struktur und Konformation von TEM-1, ß-Laktamasen aus Staphylococcus und Bacillus ergaben gleichfalls die Beteiligung verschiedener funktioneller Gruppen bei der Katalyse (Pain und Virden 1979). Bei einer anderen Penicillinase, SHV, wurde unterschiedliche Hemmbarkeit durch pCMB gefunden (Sykes und Matthew 1976). Mit Cephalosporinen als Substrat fand Hemmung der Hydrolyse statt, nicht aber mit Penicillinen als Substrat. Dies deutete ebenso auf eine zusätzliche Bindestelle für Cephalosporine im aktiven Zentrum hin.
Wahrscheinlich werden ß-Laktamantibiotika auch von den ß-Laktamasen nicht nur durch eine Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum, sondern noch von weiteren für die Katalyse wichtigen Gruppen gebunden.Die Substratsättigungskurven, die Hemmkinetiken, die Aktivierung des Enzyms durch geringe Mengen Cefotaxim, Ceftazidim und Ceftizoxim und die Substratüberschußhemmung deuten auf das Vorhandensein mehrerer Bindestellen und einer komplexen Interaktion bei Bindung und Hydrolyse hin.

Die Frage, ob in diesen Fällen sogar ein weiteres Substratmolekül gebunden werden kann, muß allerdings vorläufig offen bleiben. Hier könnte eine genaue Untersuchung des aktiven Zentrums und eine mathematische Analyse des Katalysemechanismus dieser Cephalosporinasen Aufschluß geben und so eine eindeutige Beschreibung von Bindung und Hydrolyse der ß-Laktamantibiotika erfolgen.

4.2. Mechanismus der Resistenz gegen ß-Laktamantibiotika

Wie eingangs aufgeführt, zeichneten sich die hochresistenten E. cloacae-Stämme durch konstitutive Produktion einer Cephalosporinase aus. Bei fünf Wildtyp-Mutanten -Paaren von E. cloacae wurde die Resistenzsteigerung verglichen mit der ß-Laktamase-Aktivität vor und nach Mutation zur konstitutiven Enzymproduktion. Die Wildtypen synthetisierten kaum nachweisbare(149W, 352W und 988W) oder relativ geringe Mengen an ß-Laktamase (150W und 314W). Sie waren gegen erste **Generation Cephalosporine und Cefoxitin,** nicht aber gegen dritte Generation Cephalosporine resistent. Bei den Mutanten korrelierte der Resistenzanstieg, vor allem für moderne Cephalosporine (z.B. Cefotaxim), recht gut mit der vermehrten Enzymproduktion, gegen vergleichsweise labile Substanzen (z.B. Cephaloridin) hingegen steigerte sich die Höhe der Resistenz nicht in dem Maße. Dies war ein erster Hinweis, daß hydrolytische Aktivität der ß-Laktamasen offensichtlich nicht allein ausschlaggebend für Resistenz sein konnte.
Die signifikant höheren MHK-Werte bei E. cloacae 150W und 314W für beispielsweise Cefotaxim (8, bzw. 2 µg/ml) wurden auf die ausgeprägtere ß-Laktamase-Produktion dieser Stämme, als die anderer Wildtypen,zurückgeführt. Zudem synthetisierten beide Stämme zusätzlich eine Penicillinase, TEM-1, die vor allem für die erhöhte Resistenz gegen Penicilline verantwortlich war. Die relativ hohen MHK-Werte mit Stamm 988W (Cefotaxim 4 µg/ml) konnten nicht an einer intensiveren ß-Laktamase-Synthese liegen - wie bei 149W (Cefotaxim 0.25 µg/ml) und 352W wurde kaum Aktivität gemessen - sondern hingen wahrscheinlich mit der hohen Mutationsfrequenz dieses Organismus von 10^{-4} (Korfmann, pers. Mitteilung) zusammen. Alle übrigen Wildtypen wiesen im Durchschnitt Mutationsfrequenzen von 10^{-7} auf.
Die vermehrte ß-Laktamaseproduktion nach Induktion der E. cloacae Cephalosporinase wurde schon von Sanders et al. (1979) als mögliche Ursache für die auftretende Resistenzsteigerung angenommen. Auch der immer wieder beobachtete "Inokulumeffekt" bei MHK-Bestimmung mit Cephalosporinase-produzierenden Spezies (Sykes und Matthew 1976) deutete auf

einen entscheidenden Einfluß der vorhandenen Menge an ß-Laktamase auf die Höhe der Resistenz hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Resistenzmechanismus von E. cloacae eingehend anhand zweier klinischer CTX^r Isolate (208 und 5) und zweier CTX^r Labormutanten (352M und 149M), mit konstitutiver ß-Laktamaseproduktion, untersucht.
Der Anteil der Cephalosporinase am Gesamtprotein der Organismen war vergleichsweise hoch. So synthetisierte E. cloacae 208 bei einer OD_{546} von eins 0.01 mg/ml ß-Laktamase (1.4 %), E. cloacae 149M 0.083 mg/ml (8.9 %) und E. cloacae 352M 0.087 mg/ml (11.8 %) ß-Laktamase.
Die Hydrolyse älterer Cephalosporine durch diese Enzyme erfolgte mit hoher Aktivität, zweite und dritte Generation Cephalosporine wurden jedoch so langsam inaktiviert, daß ein Abbau der Antibiotika nicht die entscheidende Ursache für Resistenz sein konnte. Deshalb wurde eine weitere Enzymeigenschaft, die Geschwindikeit, bzw. Fähigkeit der Bindung (Affinität) eines Antibiotikums an die ß-Laktamase, untersucht.

Die Affinität moderner Substanzen zu den Cephalosporinasen war tatsächlich sehr viel größer als die von Cephaloridin und vergleichbaren Cephalosporinen. Schon 1965 hatte Pollock eine Beziehung zwischen ß-Laktamase-Aktivität (V_{max}) und Affinität eines Antibiotikums zur ß-Laktamase (K_M) hergestellt, und führte den Begriff des "physiologischen Effektivitätskoeffizienten" (V_{max}/K_M) ein. Offensichtlich kompensierten die E. cloacae-ß-Laktamasen die relative "Hydrolyse-Stabilität" mancher Substrate durch besonders rasche und effektive Bindung, während bei Cephaloridin u.a. die ausgesprochen schlechte Affinität durch hohen Umsatz ausgeglichen wurde.
Then und Anghern (1982) fanden bei ihren Untersuchungen mit E. cloacae ebenfalls, daß für Ceftriaxon, Cefotaxim u.a. die Bindung an die ß-Laktamasen im Vordergrund stand. Auch bei der chromosomalen Cephalosporinase aus P.aeruginosa (SA-Enzym) konnte die recht hohe Affinität von Cefotaxim , trotz geringen enzymatischen Abbaus, für die Resistenz gegen diese Substanz verantwortlich gemacht werden (Livermore 1983).

Ein weiterer Hinweis auf die entscheidende Bedeutung der Affinität und Bindung an die ß-Laktamasen war die Entwicklung neuer Aminothiazol-Cephalosporine, wie HR810 und BMY28142. Sie zeichneten sich durch besonders schlechte Affinität zu den E. cloacae Cephalosporinasen aus. Die MHK-Werte dieser Substanzen waren, verglichen mit denen von Cefotaxim und Ceftazidim, sehr niedrig, Resistenz wurde nicht ausgeprägt (Tabelle 48). Eine ähnliche Beobachtung machte Then (pers. Mitt.) mit einem Derivat von Ceftriaxon, welches wie HR810 einen Pyridinabkömmling in 3-Stellung trug und nur geringe Affinität zu ß-Laktamasen aufwies.

Tabelle 48: Vergleich von MHK, I_{50}-Werten mit PBP's und der ß-Laktamase aus E. cloacae 208, Enzymaktivität und der Penetration moderner Cephalosporine

Cephalosporin	MHK* {µg/ml}	I_{50} {µg/ml} für ß-Laktamase	PBP I	PBP III	Enzym-aktiv.	Penetr.-faktor
Cefotaxim	128	0.02	0.02	0.002	0.014	8
Ceftazidim	256	4.5	0.5	0.05	0.006	2
HR810	8	40	1.0	0.09	0.07	2
BMY28142	1	542	n.b.	n.b.	0.002	4

* Die MHK wurde für E. coli DC0 Tk angegeben,
Enzymaktivität der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 in U/mg.
Die Ermittlung des Penetrationsfaktors erfolgte durch E. coli DC0 und DC2.
Die Affinität der PBP's wurde von Seeger et al.(pers. Mitteilung) mit E. coli bestimmt.

Die rasche Bindung moderner Cephalosporine an die E. cloacae Cephalosporinasen bewirkte zudem eine Konkurrenz zur Bindung an das eigentliche Target, die PBP's. So war für die Wirksamkeit eines Antibiotikums, neben guten Penetrationseigenschaften und ß-Laktamase-Stabilität, eine effektive Reaktion mit den PBP's von großer Bedeutung. Die Einführung der Aminothiazol-Seitenkette bei z.B. Cefotaxim, Cefmenoxim u.a. hatte eine verstärkte Affinität zu den PBP's I und III zur Folge (Curtis

et al. 1979, Shigi et al. 1981). Aufgrund der Überproduktion von ß-Laktamase in E. cloacae wurde jedoch, vor allem durch bevorzugte Bindung an die Cephalosporinase, die lethale Menge von ß-Laktamantibiotikum im periplasmatischen Raum verringert. Die Wahrscheinlichkeit der Bindung an PBP's sank bei hoher Affinität der Substanz zur ß-Laktamase.
So war das Bindeverhalten von Ceftazidim und HR810 mit PBP's von E. coli sehr ähnlich (Tabelle 48), beide reagierten etwas schlechter als Cefotaxim. Durch die höhere Affinität des Ceftazidim und die außerordentlich geringe Affinität des HR810 zu der E. cloacae Cephalosporinase (E. coli DC0 Tk produzierte die ß-Laktamase aus E. cloacae 208) prägte der Organismus Resistenz gegen Ceftazidim, nicht aber gegen HR810 aus. Bei den E. cloacae-Stämmen waren die Resistenzverhältnisse ähnlich, wahrscheinlich wiesen ihre PBP's vergleichbares Bindeverhalten zu den ß-Laktamen auf, wie die von E. coli, da PBP's taxonomisch verwandter Bakterien ohne sehr große Unterschiede mit diesen Antibiotika reagieren (Georgopapadakou und Liu 1980).

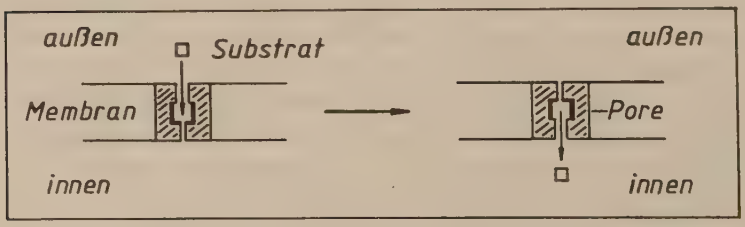
Hohe Affinität anstelle von hydrolytischer Inaktivierung und die damit verbundene Verringerung der Bindehäufigkeit an PBP's allein reichten aber als Erklärung für Resistenz gegen moderne ß-Laktamantibiotika wie Cefotaxim, Latamoxef, Azthreonam und andere nicht aus. Denn, trotz der Menge an ß-Laktamase und dem Freiwerden neuer Bindestellen durch hydrolytische Spaltung der Substanzen, konnte die Kapazität des Enzyms nicht groß genug sein, um alle im umgebenden Medium vorkommenden Antibiotika-Moleküle zu binden.
Legte man bei E. cloacae 208 die MHK von Cefotaxim mit 64 µg/ml zugrunde, so müßte der Organismus 2.4 mg/ml ß-Laktamase produzieren, um in Gegenwart von 32 µg/ml Cefotaxim alle Moleküle durch ausschließliche Bindung zu inaktivieren. Tatsächlich wurden aber nur 0.01 mg/ml ß-Laktamase synthetisiert, so daß zwischen ß-Laktamasemolekülen und Antibiotikum ein Verhältnis von 1:240 bestand. Zu ähnlichen Berechnungen kam auch Harper (pers. Mitteilung), er legte 2 x 10^5 ß-Laktamasemoleküle nach

Induktion zugrunde und fand, bei Voraussetzung einer äußeren Konzentration von 4 µg/ml, ein **Verhältnis** von 1:220 zwischen ß-Laktamase und Antibiotika-Molekülen.

Für die Effektivität des Resistenzmechanismus bei E. cloacae war offensichtlich auch die Penetrationsfähigkeit der ß-Laktamantibiotika von entscheidender Bedeutung, da der freie Zugang zum periplasmatischen Raum beschränkt sein mußte, und die Resistenz nicht auf Mutation zu veränderten Porinen, sondern nur auf konstitutiver Überproduktion der Cephalosporinase (Seeberg 1983) beruhte.
Untersuchungen zur Permeabilität der äußeren Bakterienmembran wurden vor allem mit E. coli (Richmond et al. 1976, Zimmermann und Rosselet 1977, Clark 1981), P. aeruginosa (Zimmermann 1979), sowie P. mirabilis und E. cloacae (Murakami et al. 1982, Sawai et al. 1982) durchgeführt.
Die ß-Laktam-Moleküle gelangten durch Poren der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum (Nikaido et al. 1983, Jaffé et al. 1982, Harder et al. 1981, van Alphen et al. 1978).
Die Penetration von Cephalosporinen und Penicillinen gehorchte dabei nicht den Gesetzen der einfachen Diffusion. Vielmehr lag trägervermittelter Transport, also erleichterte Diffusion vor, die unabhängig von Stoffwechselenergie ablief. Der Transport durch die Phospholipidschicht mit Hilfe der wassergefüllten Poren wies Substratspezifität auf und hing von der Ladung der Moleküle ab. Er folgte einem Konzentrationsgefälle und wurde durch die Anzahl der Poren in der äußeren Membran begrenzt (Nikaido 1979, Höfer 1977).
Hydrophobe Cephalosporine (z.B. Cefamandol mit einem Phenylrest in der C_7-Seitenkette) und monoanionische Cephalosporine (z.B. Cephalothin mit Carboxylrest am C_4) penetrierten sehr viel schlechter. Die Anwesenheit einer weiteren negativen Ladung (z.B. einer SO_3^--Gruppe) bewirkte eine Abnahme der Diffusionsgeschwindigkeit, während zusätzliche positive Ladungen (z.B. bei Cephaloridin mit Pyridinrest in 3-Stellung) die Penetration erleichterten (Nikaido et al. 1983).
Die Fähigkeit eines ß-Laktamantibiotikums in den periplasmatischen Raum zu gelangen hing zudem von Struktur und Konfigu-

ration der Moleküle ab. Der Austausch des Schwefels durch Sauerstoff bei 1-Oxacephalosporinen hatte eine verbesserte Penetration zur Folge (Yoshida 1981, Murakami et al. 1982). Bei Cefotaxim war die Konfiguration der Methoxyiminogruppe von Bedeutung. Das sterisch verschiedene Isomer, mit Methoxyiminogruppe in Anti-Konfiguration, penetrierte 20-mal schlechter als das Syn-Isomer Cefotaxim (Costa und Botta 1983). Die MHK von Cefotaxim war deshalb deutlich niedriger. Eine wichtige Rolle spielte aber auch die Konzentration eines Antibiotikums im Medium. Zimmermann und Rosselet (1977) wiesen nach, daß die Konzentration an freiem Antibiotikum im periplasmatischen Raum entscheidend von der Konzentration an Antibiotikum im umgebenden Medium abhängt.
Weiterhin wurde bei Untersuchungen mit E. coli entdeckt, daß die Poren der Bakterienmembran geschlossen und geöffnet werden können (Schindler und Rosenbusch 1978). Bei Membranen von Mitochondrien wurde eine Modellvorstellung zur Reaktion von Poren mit einem Substrat ("gated pore") entwickelt (Klingenberg 1976). Diese Poren besaßen ein Erkennungszentrum, welches sehr spezifisch reagierte und hinter dem die Pore geschlossen war. Bei Bindung eines geeigneten Substratmoleküls fand eine Konformationsänderung statt, der verschlossene Teil wurde geöffnet und im Gegenzug schloß sich der andere Teil (Abb. 60). Eventuell liegt bei Bakterien ein ähnlicher Mechanismus vor.

Abb. 60: Modellvorstellung einer verschlossenen Pore (nach Klingenberg 1976, aus Höfer 1977).



Neben Enzymaktivität und -affinität wurde nun auch der Einfluß der Penetrationsfähigkeit von Penicillinen und Cephalosporinen auf die Höhe der Resistenz untersucht. Bei Bestimmung der Penetrationsfaktoren mit E. coli DC0 (intakte äußere Membran) und E. coli DC2 (defekte äußere Membran) wies Cefuroxim den höchsten Faktor unter den verwendeten Cephalosporinen auf. In Anwesenheit von EDTA, welches als Chelatbildner die zur Stabilisierung der äußeren Membran notwendigen Ca^{++}-Ionen wegfing (Nikaido 1979), konnte bei Wachstum mit Cefuroxim der ausgeprägteste Einfluß auf E. cloacae 352M beobachtet werden. Die Penetration der anderen untersuchten Cephalosporine wurde nicht im gleichen Maße erleichtert, aber auch dort erfolgte in Gegenwart von EDTA ein schnellerer Abbau durch die periplasmatische ß-Laktamase der wachsenden Kulturen.
Die hohe Resistenz der E. cloacae Stämme gegen Penicilline, trotz vergleichsweise geringer Hydrolyse und relativ niedriger Affinität zu der ß-Laktamase, beruhte sicher ebenfalls auf verminderter Penetrationsfähigkeit. Vor allem Oxacillin und Acylureidopenicilline wiesen sehr hohe Penetrationsfaktoren auf.
Ein weiterer wichtiger Hinweis für den Einfluß der Permeabilität der äußeren Membran auf Resistenz war die Bestimmung der Kryptizität (Verborgenheit) der ß-Laktamase. Schon Richmond und Sykes (1973) hatten eine lineare Beziehung zwischen MHK einer Substanz und Kryptizität der ß-Laktamase gefunden. Hierbei wurde die Durchlässigkeit der Bakterienmembran für verschiedene ß-Laktamantibiotika anhand der Enzymaktivität aufgeschlossener (freier Zugang) und intakter Zellen (von der Penetrationsfähigkeit abhängiger Zugang) ermittelt.
Meßungen mit Cefotaxim und Cefamandol für E. cloacae machten die intensive Konzentrationsabhängigkeit der Kryptizität vor allem bei schlecht penetrierenden Substanzen deutlich. Mit steigender äußerer Konzentration gelangte eine signifikant größere Anzahl von Molekülen in den periplasmatischen Raum. Die MHK, bzw. MBK eines Antibiotikums bezeichnete offensichtlich jene Menge, bei welcher die eindringende Zahl an ß-Laktam-

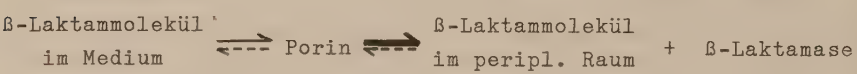
Molekülen nicht mehr durch Bindung an die ß-Laktamase und durch Hydrolyse bewältigt werden konnte, und so die Wahrscheinlichkeit der Bindung an PBP's anstieg.
Von den untersuchten Antibiotika penetrierte Azthreonam besonders schlecht, möglicherweise lag dies an der zusätzlichen negativen Ladung des Moleküls aufgrund der SO_3^--Gruppe.
Die Kryptizität der ß-Laktamase aus E. cloacae 208 mit Cephaloridin, Cephalothin und auch Cefotiam als Substrat war deutlich niedriger und weniger konzentrationsabhängig. Diese Substanzen wurden auch sehr viel rascher abgebaut.
Die freie periplasmatische Konzentration von Azthreonam, Cefotaxim und Cefamandol, anhand der Formel von Zimmermann und Rosselet (1977) errechnet, war selbst im Bereich der MHK außerordentlich gering. Mit den gut abbaubaren Cephalosporinen hingegen war die periplasmatische Konzentration im Bereich der MHK gleich der äußeren Konzentration. Wegen der schlechteren Affinität der älteren Cephalosporine (Curtis et al. 1979) konnte die Bakterienzelle wahrscheinlich eine höhere Anzahl dieser Moleküle tolerieren, bevor die PBP's lethal gehemmt wurden, die modernen Substanzen besaßen weitaus größere Affinität zu den essentiellen PBP's.
Die Permeabilitätsschranke der vier untersuchten E. cloacae-Stämme wies leichte Unterschiede auf. Bei E. cloacae 149M und 208 gelangten die Antibiotika-Moleküle relativ schnell in die Zellen, während sich E. cloacae 352M durch ausgesprochen langsame Aufnahme auszeichnete. Dies wirkte sich auch auf die MHK der verschiedenen ß-Laktamantibiotika aus, Stamm 352M hatte eine im allgemeinen immer ein bis zwei Stufen höhere Resistenz, als die anderen Stämme. E. cloacae 208 glich eventuell die geringere Enzymmenge und die größere Permeabilität seiner äußeren Membran durch höhere Enzymaktivität aus, Stamm 149M produzierte wie Stamm 352M sehr viel mehr ß-Laktamase, lag aber meist niedriger in der Resistenz und zeigte wie Stamm 208 eine ausgeprägte Beeinträchtigung bei Wachstum in Gegenwart geringer Cefotaxim-Konzentrationen. E. cloacae 5 hatte vielleicht weniger empfindliche PBP's als die übrigen Stämme, denn obwohl die periplasmatische Konzentration von Cefotaxim im Bereich der MHK höher war, konnte kaum Störung des Wachs-

tums bei niedrigen Cefotaxim-Konzentrationen gefunden werden.

Zur weiteren Erhellung des Einflußes der Penetration auf die Resistenz wurde ein Plasmid (pBP100) mit dem bla-Gen aus E. cloacae 208 (Seeberg 1983) in E. coli DC0 und die Mutante DC2 mit defekter äußerer Membran übertragen. Die Höhe der Resistenz nach Erhalt des Plasmids korrelierte mit der von E. cloacae 208. Die MHK-Werte der verschiedenen Penicilline und Cephalosporine lagen bei der Penetrationsmutanten DC2 Tk immer um einen Faktor zwei niedriger als beim Wildtyp DC0 Tk. Nun traten aber mit dem sensiblen E. coli Paar sehr viel größere Unterschiede in der MHK auf, bei Cefotaxim beispielsweise ein Faktor von 8, bei Cefamandol von 16 und bei Cefuroxim sogar von 32. Die Versuche mit radioaktivem Cefotaxim zeigten deutlich, daß auch bei dem E. coli Paar ohne die E. cloacae-ß-Laktamase eine Konzentrationsabhängigkeit der Penetration vorlag. Bei einer äußeren Konzentration von 64 µg/ml Cefotaxim betrug der Faktor mit den sensiblen E. coli-Stämmen ebenfalls zwei. Da kein Enzym vorlag, welches immer wieder Substrat abbaute, war die Menge, die aufgenommen wurde,natürlich sehr viel niedriger.
Der Defekt in der äußeren Membran von E. coli DC2 kam offensichtlich vor allem bei geringerer äußerer Konzentration zum Tragen, hier wurden sehr viel leichter Moleküle aufgenommen als beim intakten Wildtyp. Die Höhe der MHK des Wildtyps und der Penetrationsmutante hing von der Menge an Antibiotikum im periplasmatischen Raum ab, die gerade nicht mehr toleriert werden konnte. Da die sensiblen E. coli keine ß-Laktamase besaßen, lag die MHK sehr niedrig und wurde lediglich durch Penetrationsfähigkeit und Affinität der ß-Laktam-Moleküle zu den PBP's bestimmt. Das resistente E. coli-Paar nahm aufgrund der Cephalosporinase sehr viel mehr Cefotaxim auf, die lethale Menge im periplasmatischen Raum wurde aber durch Bindung und Hydrolyse eingeschränkt, sodaß auch bei 32, bzw. 64 µg/ml Cefotaxim im Medium noch Wachstum möglich war.
Die äußere Bakterienmembran stellte einen recht wirksamen Schutz dar. Neben der Spezifität der Poren (Nikaido et al.

1983) hing die Penetration von ß-Laktamantibiotika bei den untersuchten E. cloacae und E. coli-Stämmen deutlich von der Konzentration im Medium und von der ß-Laktamase-Aktivität im periplasmatischen Raum ab. Je höher die äußere Konzentration war, desto stärker auch das Bestreben in den periplasmatischen Raum (niedrige Konzentration) zu gelangen. Dies wurde sicherlich beschränkt durch die Anzahl der Porine in der äußeren Membran, ähnlich wie bei Enzym-Substrat-Beziehungen konnte man sich die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem Substanzmolekül, Bindung an ein Porin und die Freisetzung in den periplasmatischen Raum vorstellen (Abb. 61). Ein sofortiger Konzentrationsausgleich war also nicht möglich, vielmehr gelangte immer nur ein sehr kleiner Teil der vorhandenen Antibiotikums in die Bakterienzelle. Befand sich dort eine ß-Laktamase, wie bei E. cloacae, so wurde das ß-Laktam gebunden und mehr oder weniger rasch hydrolysiert. Durch den Abbau fand eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Bakterienzelle statt, neue Moleküle folgten und solange die lethale Dosis nicht überschritten wurde, konnte der Organismus auch in Gegenwart höherer Antibiotika-Konzentrationen noch wachsen.

Abb. 61: Schematische Darstellung der Reaktion von ß-Laktam-Antibiotikum und Porin



Die MHK, bzw. MBK der untersuchten ß-Laktamantibiotika (Cefotaxim, Cefamandol und Azthreonam) lag bei den vier E. cloacae-Stämmen in einem Bereich, bei dem eigentlich noch ausreichende Bindung an die vorhandene Menge an Enzym und Inaktivierung der Antibiotika durch Hydrolyse hätte erwartet werden können. Tatsächlich aber wurde das Wachstum gehemmt. Hierfür gab es zwei Erklärungen, zum einen reagierte ein Teil der Antibiotika-Moleküle natürlich auch immer mit den PBP's. Gerichtete Bewegung der Moleküle fand keine, sondern aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ein zufälliges Zusammentreffen mit dem Target

statt. In Abhängigkeit von der Affinität des Antibiotikums zur ß-Laktamase und zu den PBP's kam die Bindung schnell oder langsam zustande, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Bindung war höher oder niedriger. Zum anderen lag die ß-Laktamase nicht frei im periplasmatischen Raum vor, sondern war möglicherweise locker membranassoziiert. Wahrscheinlich saß sie, wie die PBP's, in der Cytoplasmamembran, allerdings als peripheres und nicht als integrales Protein. Aufgrund der hohen Zahl an ß-Laktamase-Molekülen in überproduzierenden E. cloacae-Stämmen und der ausgeprägten Affinität der modernen ß-Laktamantibiotika, wurden diese vor allem an die Enzymmoleküle, mit einer gewissen Häufigkeit aber auch an die PBP's gebunden. Überstieg die Anzahl der ß-Laktam-Moleküle eine bestimmte Höhe, so wurden mehr PBP's inaktiviert und die Zellen vollständig im Wachstum beeinträchtigt.
Im Unterschied zu den Cephalosporinen und vielen Penicillinen reagierten das Amidinopenicillin Mecillinam und das Carbapenem Thienamycin fast ausschließlich mit PBP II (Weaver et al. 1979, Spratt et al. 1977, Spratt 1977, Curtis et al. 1979). Gegen beide Substanzen wurde bei E. cloacae keine Resistenz ausgebildet, obwohl N,F-Thienamycin zum Beispiel eine relativ hohe Affinität zur E. cloacae-ß-Laktamase hatte. Entscheidend war jedoch auch die Zahl der PBP's, die ohne Schaden für die Zelle inaktiviert werden konnten. Aufgrund der selektiven Wirkung mit PBP II, das zudem in geringerer Menge vorlag als PBP I und III (Neu 1982), erfolgte offensichtlich schon bei sehr niedriger periplasmatischer Konzentration Wachstumshemmung. Betrachtete man die anderen Parameter, so wurde die fehlende Resistenz ebenfalls verständlich. Mecillinam wurde zwar etwas besser als Cefotaxim abgebaut, hatte aber eine sehr niedrige Affinität zur ß-Laktamase, vergleichbar der von HR810 und BMY21842, gegen die auch keine Resistenz bestand. N,F-Thienamycin penetrierte sehr viel leichter durch die äußere Membran und wurde von der ß-Laktamase praktisch überhaupt nicht hydrolysiert und wirkte so vor allem als ß-Laktamase-Inhibitor (Toda et al. 1980). Die Affinität zu den PBP's war zudem höher als zur ß-Laktamase.

Auch bei Wachstumsversuchen mit den verschiedenen E. cloacae-Stämmen in Anwesenheit von Cefotaxim, Azthreonam und Latamoxef wurde der Einfluß von Penetration und Bindung an PBP's, zusätzlich zur Bindung an die jeweilige Cephalosporinase und Hydrolyse durch die ß-Laktamasen deutlich.
Die ß-Laktamasen aus E. cloacae 352M und 149M wiesen sehr ähnliche Enzymaktivitäten mit Cefotaxim auf, der Abbau in wachsenden Kulturen jedoch ging bei 149M viel rascher vonstatten. Gleichzeitig wurde selbst bei hohen Konzentrationen, im Bereich der MHK, der Wachstumsverlauf von 352M nicht wesentlich beeinflußt, während Stamm 149M schon durch geringe Mengen empfindlich im Wachstum gestört wurde. Die Kryptizitätsmessungen ergaben für E. cloacae 352M eine sehr viel ausgeprägtere Permeabilitätsschranke. E. cloacae 208 wies von allen untersuchten Stämmen die aktivste Cephalosporinase auf. Möglicherweise waren aber die PBP's dieses Organismus empfindlicher, als beispielsweise die von E. coli DC0 und DC2. Nur in Gegenwart von 8 µg/ml Cefotaxim konnten bei Stamm 208 ungestörtes Wachstum beobachtet werden, die E. coli-Stämme wuchsen nach Erhalt des R-Faktors pBP100 selbst bei hohen Konzentrationen vergleichsweise ungestört. Filamentbildung bei sublethalen Konzentrationen (Greenwood und Eley 1981, Yourassowsky et al. 1981 a/b), ein häufig beobachtetes Phänomen, wurde nur bei Stamm 208, nicht aber bei den Transkonjuganten gefunden. Fügte man Cefotaxim oder Ceftriaxon erst bei einer OD_{546} von eins zu Kulturen von E. cloacae 208 und 149M, so trat eine Art von "Inokulumeffekt" auf. Das Wachstum verlief völlig normal, die bereits in größerer Menge vorhandene ß-Laktamase konnte einen erheblichen Teil des Cefotaxims binden und inaktivieren, wobei der Druck der Gesamtkonzentration auf die einzelne Bakterienzelle rascher abnahm.
Azthreonam penetrierte sehr schlecht durch die Bakterienmembran, selbst nach 22 h waren noch erhebliche Mengen im Medium nachweisbar. Das Wachstum in Anwesenheit von Azthreonam wurde auch bei E. cloacae 352M weitaus intensiver beeinträchtigt, als mit Cefotaxim. Da Azthreonam nur langsam inaktiviert wurde, reagierte ein größerer Teil mit den PBP's. E. coli DC0 Tk und DC2 Tk

wiesen dagegen keine so intensive Wachstumsstörung auf. Möglicherweise hing dies mit der unterschiedlichen Affinität von Azthreonam zu den PBP's von E. cloacae und E. coli zusammen. So reagierte Azthreonam bei E. coli ausschließlich mit PBP III, bei E. cloacae fand zusätzlich noch Bindung an PBP V und VI statt (Sykes et al. 1981). Obwohl über die Funktion von PBP V und VI noch nicht sehr viel bekannt ist, und ihre ausschließliche Hemmung keine schwerwiegenden Folgen für die bakterielle Zelle zu haben scheint, kommt ihnen möglicherweise eine Hilfs-, bzw. Ersatzfunktion beim Ausfall anderer PBP's zu (Waxman und Strominger 1983).
Latamoxef wurde ähnlich langsam wie Azthreonam abgebaut. Die Wirkung auf den Verlauf der Wachstumskurve war aber nicht so ausgeprägt. Dies könnte an der etwas schlechteren Affinität von Latamoxef zu den PBP's gelegen haben (Komatsu 1980).
Auch bei Cefotaxim bewirkte die Einführung einer 7α-Methoxygruppe eine Verminderung der Affinität des Moleküls zu PBP I (0.02 µg/ml → 0.15 µg/ml) und PBP III (0.002 µg/ml → 0.19 µg/ml) von E. coli K12 (Dürckheimer 1982).
Bei Wachstumsversuchen mit Cefotaxim konnte nach Abbau des Antibiotikums das Spaltprodukt PI (R_F von 0.66) im Medium nachgewiesen werden, ein deutlicher Hinweis, daß das Verschwinden des Cefotaxims im Verlaufe des Wachstums auf enzymatischer Inaktivierung beruhte. Das Spaltprodukt diffundierte bei E. coli DC0 Tk sehr viel später ins Medium als bei DC2 Tk und E. cloacae 208.

Mit dem Resistenzmechanismus gram-negativer ß-Laktamase-produzierender Bakterien haben sich schon viele Arbeitsgruppen beschäftigt. Neben der zentralen Bedeutung der ß-Laktamase wurden aber immer wieder auch andere Parameter, wie Penetrationsbarriere, Affinität zu den PBP's und Menge an ß-Laktamase, als sogenannte "intrinsic factors" für die Resistenz mitverantwortlich gemacht (Richmond und Sykes 1973, Richmond 1978, Curtis et al. 1979, Zimmermann 1979, Neu 1982).
Eine umfassend durch Datenmaterial (sowohl mit Cephalosporinen, als auch mit Penicillinen) unterstützte Theorie aber, die den Resistenzmechanismus allgemeingültig, unter Berücksichtigung

aller Faktoren, erklärte, fehlte bislang.

Besonderes Interesse für den Mechanismus der Resistenz von E. cloacae und andere Enterobakterien entwickelte sich, als nach Einführung der sogenannten ß-Laktamase-stabilen dritte Generation Cephalosporinen verstärkt resistente Organismen auftraten (Olson et al. 1983, Klastersky 1983).
Während die Cephalosporinase aus P. vulgaris Cefmenoxim u.a. mit hoher Aktivität zu hydrolysieren vermochte (Matsubara et al. 1981, Okonogi et al. 1981), blieb der Mechanismus bei E. cloacae und C. freundii, deren ß-Laktamase diese Substanzen kaum hydrolysierte (Mitsuhashi et al. 1981), weitgehend unbekannt.
Yokota und Azuma hatten schon 1980 eine von ß-Laktamasen errichtete Barriere zum Schutz der PBP's vermutet und Minami et al. (1980) kamen aufgrund ihrer Untersuchungen zu einem ähnlichen Schluß. Sanders (1983) postulierte eine aus ß-Laktamase-Molekülen bestehende "non-hydrolytic-barrier" für moderne Substanzen, die weder auf Hydrolyse, noch auf Bindung der Antibiotika beruhte, sondern lediglich ein mechanisches Hindernis auf dem Weg der ß-Laktame zu den PBP's darstellte.Diese Barriere wirkte anscheinend nur gegen Antibiotika, welche an PBP I und III banden, da gegen solche, die vor allem an PBP II binden (Mecillinam und N,F-Thienamycin) keine Resistenz ausgebildet wurde (Sanders et al. 1982).
Diese nicht-hydrolytische Barriere konnte aber die fehlende Resistenz gegen Substanzen, wie HR810 und BMY28142, welche ebenfalls mit PBP I und PBP III reagieren, nicht erklären. Then und Angehrn (1982) schlugen hingegen einen "trapping mechanism" vor, bei dem ausschließlich die hohe Affinität und damit die Bindung der modernen Cephalosporine an die ß-Laktamasen, für die Resistenz verantwortlich sein sollte. Bindung allein konnte jedoch, eine Berechnung des Verhältnisses von Enzymmolekülen und Antibiotikum zeigte dies, nur unzureichend die Resistenz gegen Substanzen mit hoher Affinität und geringer Abbaubarkeit erklären, da nicht genug ß-Laktamase produziert wurde, um alle ß-Laktammoleküle zu binden.

Bereits 1974 hatten Richmond und Curtis erkannt, daß die Affinität von ß-Laktamantibiotika zur ß-Laktamase eine wichtige Variable bei der Erklärung von Resistenzphänomenen sein konnte, gleichzeitig aber auch auf die Bedeutung der äußeren Membran als Permeabilitätshindernis hingewiesen (Richmond und Sykes 1973). Zimmermann (1978) hob die Penetrationsfähigkeit als wesentliche Kodeterminante für die Effektivität eines ß-Laktamantibiotikums hervor.

Die bislang erstellten Erklärungsversuche für einen Resistenzmechanismus ließen immer wieder Fragen offen und in der vorliegenden Arbeit wurden nun die verschiedenen Parameter bestimmt und zu einander in Beziehung gebracht.
Eine ausschließliche Korrelation zwischen MHK und Enzymaktivität einerseits und Enzymaffinität andererseits, wurde nicht gefunden. Vielmehr mußten auch Penetrationsfähigkeit einer Substanz, Affinität zum Target (PBP's), Anzahl der essentiellen PBP's an die gebunden werden konnte und nicht zuletzt die ß-Laktamase-Menge berücksichtigt werden.

Somit beruhte die Resistenz bei E. cloacae-Stämmen, die eine chromosomale ß-Laktamase überproduzierten, auf einem komplexen Zusammenspiel der verschiedenen Parameter, die von der Struktur eines Antibiotikums abhingen und vom Bakterium selbst.
Nicht die Hydrolyse stand bei den modernen Antibiotika im Vordergrund, sondern die hohe Affinität zu der Cephalosporinase. Ganz wesentlich für Ausbildung und Höhe der Resistenz war die Wahrscheinlichkeit, mit der ß-Laktamantibiotika an die PBP's binden konnten. Dies hing von der Menge, die in den periplasmatischen Raum penetrieren konnte,und von der Affinität zu den PBP's ab, aber auch von der Anzahl von PBP's, an die gebunden werden konnte, ohne daß der Zelle allzugroßer Schaden erwuchs. Diese Wahrscheinlichkeit der Schädigung wurde stark verringert durch die große Anzahl von ß-Laktamase-Molekülen mit ausgeprägter Affinität zu den neueren Substanzen. Antibiotika, welche eine schlechte Affinität aufwiesen und auch nicht entsprechend hydrolysiert wurden, hemmten dagegen das bakterielle Wachstum. Bei Cefotaxim u.a. spielte die

hydrolytische Inaktivierung zwar eine nachgeordnete Rolle, völlig außer acht aber konnte sie nicht gelassen werden, da immer wieder neue Bindestellen für nachfolgende ß-Laktam-Moleküle freiwerden mußten. Einige Substanzen, vor allem moderne Penicilline und Azthreonam penetrierten relativ schlecht durch die äußere Membran. Der Penetration aber war in den anderen Hypothesen zum Resistenzmechanismus gegen ß-Laktam-antibiotika viel zu wenig Beachtung geschenkt worden. Dabei hatten schon Richmond und Sykes (1973) erkannt, daß die Wirkung einer gegebenen Menge ß-Laktamase umso größer war, je weniger ß-Laktam-Moleküle in den periplasmatischen Raum gelangten.
Tatsächlich war die Enzymaktivität ganzer Zellen zum Teil erheblich geringer, als die aufgeschlossener Zellen und auch die periplasmatische Konzentration von beispielsweise Cefotaxim sehr niedrig, verglichen mit der äußeren Konzentration. Bei Substanzen, wie Cephaloridin, welche sehr gut penetrierten, war die MHK bei weitem nicht so hoch, wie man es aufgrund der hervorragenden Aktivität der ß-Laktamase aus E. cloacae hätte erwarten können.
Möglicherweise spielte auch die Orientierung der ß-Laktamase im periplasmatischen Raum eine Rolle. Sanders (1983) war von einer freien Beweglichkeit der Enzymmoleküle ausgegangen. Die vorliegenden Ergebnisse sprachen jedoch für lockere Assoziation der ß-Laktamase mit der Cytoplasmamembran. Dies würde eine ungeordnete Bewegung verhindern und eventuell eine strategisch günstige Verteilung auf der Cytoplasmamembran bewirken. Eine Verknüpfung mit der inneren Membran hätte zudem eine Ausrichtung des aktiven Zentrums in den periplasmatischen Raum zur Folge. Bei einer peripheren ß-Laktamase wäre eine sofortige Reaktion zwischen Enzym und Substrat begünstigt, während bei freier Beweglichkeit der Cephalosporinase sich die Antibiotika-Moleküle von allen Seiten nähern und somit eine Bindung seltener erfolgen könnte.

Die Untersuchungen zeigten deutlich, daß Resistenz gegen ß-Laktamntibiotika ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren war (Abb. 62). Demnach beruhte der

Mechanismus der Resistenz bei E. cloacae vornehmlich auf vier Hauptfaktoren:

1) Menge an ß-Laktamase
2) Affinität zur ß-Laktamase in Konkurrenz zur Affinität zu den PBP's
3) Hydrolyse der ß-Laktamantibiotika durch die ß-Laktamase
4) Penetrationsfähigkeit der ß-Laktamantibiotika

Die Anzahl und Lokalisierung der PBP's und die Hemmung der ß-Laktamase durch die ß-Laktamantibiotika spielten ebenfalls eine Rolle.
Die vier Hauptfaktoren wurden in einer Formel zusammengefaßt. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, daß das Zusammenwirken dieser Parameter tatsächlich für die Resistenzhöhe verantwortlich war. Gemessener und aus den Daten errechneter MHK-Wert korrelierten besonders bei den modernen Substanzen recht gut.
Die große Bedeutung der Affinität zur ß-Laktamase wurde hierbei noch einmal deutlich. Die errechneten Werte für einige, vor allem gut zu hydrolysierende Substanzen wie Cephaloridin waren zu niedrig. Dies lag möglicherweise daran, daß die Aktivität des Enzym unter natürlichen Bedingungen in der Bakterienzelle höher war als im Rohextrakt. Ein anderer sehr wichtiger Grund für den Unterschied zwischen gemessenem und errechnetem Wert aber könnte an der Art der Affinitätsbestimmung liegen. Wahrscheinlich gab der I_{50}-Wert bei labileren Substraten nicht die wahren Affinitätsverhältnisse wieder. Der K_s- oder K_i-Wert waren womöglich niedriger, da beim I_{50}-Wert nur die Kompetition um die Bindestelle des ß-Laktamrings wiedergespiegelt wurde. Bei Cephalothin wiesen K_s- und I_{50}-Wert große Übereinstimmung auf, hier korrelierten auch der gemessene und der mit der Formel errechnete MHK-Wert, während bei Cephaloridin ein erheblicher Unterschied zwischen K_s- und I_{50}-Wert vorlag. Grundsätzlich aber konnte gezeigt werden, daß diese vier Hauptfaktoren für die Ausbildung von Resistenz verantwortlich sind (Abb. 63).

Wahrscheinlich liegt der durch ß-Laktamasen vermittelten Resistenz ein allgemeiner Mechanismus zugrunde, der nicht nur

Abb. 62: Schematische Darstellung der Verhältnisse bei sensiblen und resistenten E. cloacae-Stämmen

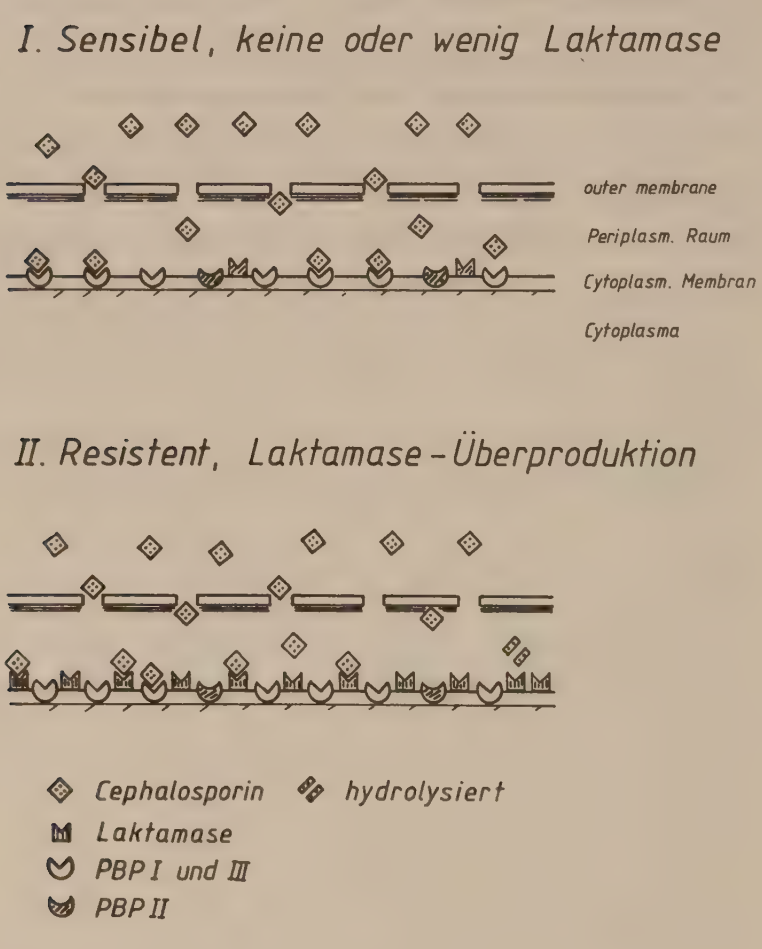
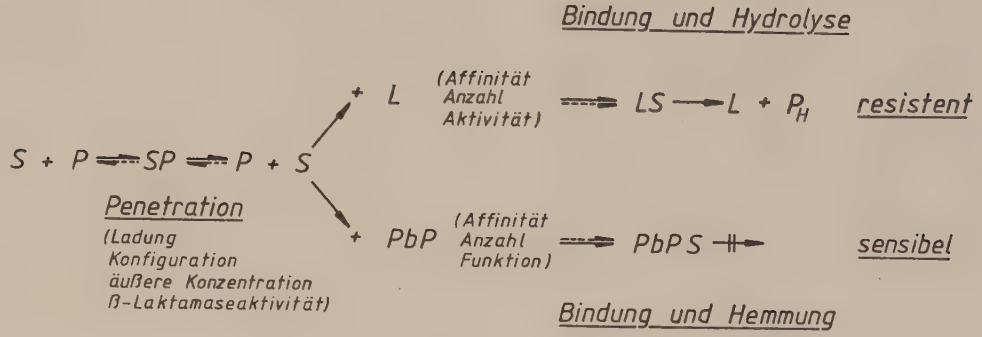


Abb. 63: Verknüpfung der verschiedenen Faktoren, die zu Resistenz führen können



S - Substanz
P - Porin
L - ß-Laktamase

PBP - Penicillin-binde-Protein
P_H - Hydrolyseprodukte
⇒ - schnelle oder langsame Bindung, abhängig von der Affinität

für die Cephalosporinase aus E. cloacae Gültigkeit hat. So machten Richmond und Curtis (1974) die hohe Affinität der ß-Laktamase von Staphylokokken für Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verantwortlich. Growlesmith und Howe (1980 a/b) untersuchten das Resistenzverhalten von E. coli mit TEM-2 und einem durch Mutation in der Affinität verändertem Enzym. Der E. coli-Stamm mit der Penicillinase, die die schlechtere Affinität besaß, zeigte signifikant geringere MHK für verschiedene ß-Laktamantibiotika als der Stamm mit dem unveränderten TEM-2.
Untersuchung der verschiedenen Parameter bei E. coli DC0 mit den Penicillinasen TEM-1, Oxa-1 und SHV, im hiesigen Institut (Dorn, Bömmer pers. Mitteilung), bestätigten gleichfalls ein enges Zusammenwirken dieser Faktoren bei der Resistenz. Und auch bei den Cephalosporinasen aus P. vulgaris oder P. cepacia, welche moderne Substanzen hydrolysieren, wird letztlich ein Zusammenspiel von Aktivität und Affinität, von Penetration und gebildeter Enzymmenge für die Höhe der Resistenz gegen die verschiedensten ß-Laktamantibiotika verantwortlich sein.

Hydrolyse einer Substanz ist lediglich eine vordergründige Erscheinung, für die Effektivität eines Antibiotikums, vor allem gegen ß-Laktamase-Produzenten, sind nicht ß-Laktamase-Stabilität allein, sondern noch andere Faktoren verantwortlich. Dies wird sehr schön durch die jüngst entwickelten Aminothiazol-Cephalosporine mit geringer Affinität zu ß-Laktamasen bei gleichbleibender Affinität zu den PBP's (HR810 und BMY28142), deutlich.

5. Zusammenfassung

Die Hydrolyse durch ß-Laktamasen wurde bislang als wichtigste Ursache für Resistenz von Bakterien gegenüber ß-Laktamantibiotika angesehen. Nachdem sich aber herausstellte, daß ß-Laktamasen auch dann die Ursache für die Resistenz sind, wenn sie das fragliche ß-Laktamantibiotikum, seiner "Stabilität" wegen, garnicht oder nur geringfügig zu hydrolysieren vermögen, trat erneut die Frage nach dem Mechanismus der Resistenz auf.
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Affinität des ß-Laktamantibiotikums zur ß-Laktamase wesentlich zur Unempfindlichkeit von E. cloacae beiträgt. Zusätzlich wurden der Einfluß der Penetration der Antibiotika durch die äußere Membran der Bakterienzelle und die Affinität zu den PBP's untersucht. Durch Aufstellen einer Formel, in der der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Größen berücksichtigt wird, konnte bewiesen werden, daß kein neuer Resistenzmechanismus gegenüber ß-Laktamantibiotika durch eine nicht-hydrolytische Enzymschranke vorliegt, sondern eine komplexe Wechselwirkung zwischen den oben genannten vier Hauptfaktoren zu einer entsprechenden Verminderung der Wirksamkeit führt.

Weiterhin wurden vier Cephalosporinasen aus verschiedenen E. cloacae-Stämmen gereinigt und biochemisch wie kinetisch charakterisiert. Das Molekulargewicht liegt bei 35 000 - 39 000, es handelt sich um Monomere. Die IP's betragen 7.8, 8.0 und 8.8, das pH-Optimum liegt bei 8.0 und das Temperatur-Optimum bei 40°C. Hemmung der ß-Laktamasen erfolgt durch Cloxacillin, nicht aber durch pCMB. Bei diesen Enzymen handelt es sich offensichtlich um typische Cephalosporinasen vom C-Typ. Die Hydrolyseprodukte einiger älterer und moderner Cephalosporine wurden untersucht und die Herkunft aus dem Molekül bestimmt. Die Substratsättigungskurven mit verschiedenen Cephalosporinen verlaufen nicht-hyperbolisch, Aminothiazol-Cephalosporine sind sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive Inhibitoren, welches auf einen komplizierten Binde- und Hydrolyse-Mechanismus ("slow-transition") hindeutet.

6. Literaturverzeichnis

Abraham, E.P. Chain, E.B.	1940	An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 146, 837
Abraham, E.P.	1981	Discovery, chemistry, and antibacterial properties of cephalosporins. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics. Academic Press, pp. 311
Abraham, E.P.	1983	Aspects of the biosynthesis of ß-lactam antibiotics. 13th International Congress of Chemotherapy, Main Lectures 1/1, Wien
Ainslie Jr., G.R. Shill, J.P. Neet, K.E.	1972	Transient and cooperativity. J. Bacteriol. 247, 7088
Ambler, R.P.	1980	The structure of ß-lactamases. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 289, 321
Angus, B.L. Carey, A.M. Caron, D.A. Kropinski, A.M.B. Hancock, R.E.W.	1982	Outer membrane permeability in Pseudomonas aeruginosa: comparison of a wild-type with a antibiotic supersusceptible mutant. Antimicrob. Agents Chemoth. 21, 299
Baddiley, J.	1981	Overview of the chemistry and biochemistry of bacterial walls and unique prokaryotic polymers. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics. Academic Press, pp. 13

Beckmann, Ch.	1983	Die Bedeutung von ß-Laktamasen für die Resistenz von Pseudomonas aeruginosa gegenüber Cefotaxim und Cefsulodin. Doktorarbeit an der Med. Fak. der Rhein.-Fried.-Wilh.-Univer., Bonn
Bergström, S. Normark, S.	1979	ß-Lactam resistance in clinical isolates of Escherichia coli caused by elevated production of the ampC-mediated chromosomal ß-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 16, 427
Bergström, S. Olsson, O. Normark, S.	1982	Common evolutionary origin of chromosomal beta-lactamase genes in Enterobacteria J. Bacteriol. 150, 528
Bisswanger, H.	1979	Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim
Bodey, G.P. Pan, Th.	1977	Mezlocillin: in vitro studies of a new broad-spectrum penicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 11, 74
Bruns, W.	1980	ß-Laktamasen-unabhängige Resistenz gegenüber ß-Laktamantibiotika bei Staphylokokken. in: Die Resistenz gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika, Hrsg. B. Wiedemann, S. 113
Cama, L.	1982	Design of ß-lactamase stable cephalosporins. FAC 1, 27

Chamberlain, J. Coombes, J.D. Dell, D. Fromson, J.M. Ings, R.J. Macdonald, C.M. McEwen, J.	1980	Metabolism of cefotaxime in animals and man. J. Anti. Chem. 6, Suppl. A, 69
Charnas, R.L. Fisher, J. Knowles, J.R.	1978	Chemical studies on the inactivation of Escherichia coli RTEM ß-lactamase by clavulanic acid. Biochem. 17, 2185
Christensen, B.G.	1981	Structure-activity relationships in ß-lactam antibiotics. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antbiotics, Academic Press, pp. 101
Citri, N. Pollock, M.R.	1966	The biochemistry and function of ß-lactamase (penicillinase). Adv. Enzymol. 28, 237
Citri, N.	1974	Penicillinase and other ß-Lactamase. Boyer: The Enzymes, 3rd edition, vol. IV, pp 23, Academic Press
Clark, D.	1981	Permeability and susceptibility of Escherichia coli to ß-lactam compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 19, 369
Cleveland, D.W. Fischer, S.G. Kirschner, M.W. Laemmli, U.K.	1977	Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102

Concia, E.
Marone, P.
Dos Santos, C.
Monzillo, V.
Farina, C.
1983 In vitro antibacterial activity of ceftazidime, a new broad spectrum cephalosporin with high activity against Pseudomonas. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien, 57/1

Costa, A.
Botta, G.A.
1983 Configuration of the methoxy-imino group and penetration ability of cefotaxime and its structural analogues. J. Antibiotics 36, 1007

Crowlesmith, I.
Howe, T.G.B.
1980a Characterization of ß-lactamase-deficient (bla) mutants of the R plasmid R1 in Escherichia coli K-12 and comparison with similar mutants of RP1. Antimicrob. Agents. Chemother. 18, 667

Crowlesmith, I.
Howe, T.G.B.
1980b Quantitative correlation between penicillin resistance and ß-lactamase activity specified by the R plasmid R1, R1 bla-45, and RP1 in Escherichia coli K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 675

Curtis, N.A.C.
Brown, C.
Boxall, M.
Boulton, M.G.
1979a Inhibition of Escherichia coli K-12 by ß-lactam antibiotics with poor antibacterial activity: interaction of permeability and intrinsic activity against penicillin-binding proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 332

Curtis, N.A.C.
Orr, D.
Ross, G.W.
Boulton, M.G.
1979b Competition of ß-lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Klebsiella aerogenes, Proteus rettgeri, and Escherichia coli: comparison with antibacterial activity and effects upon bacterial morphology.
Antimicrob. Agents Chemother.
16, 325

Curtis, N.A.C.
Orr, D.
Ross, G.W.
Boulton, M.G.
1979c Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12 and their antibacterial activity.
Antimicrob. Agents Chemother.
16, 533

Dale, J.W.
Smith, J.T.
1971 Some relationships between R-factor and chromosomal ß-lactamases in gram-negative bacteria.
Biochem. J. 123, 507

Datta, N.
Kontomichalou, P.
1965 Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factors in Enterobacteria.
Nature, 208, 239

Datta, N.
Richmond, M.H.
1966 The purification and properties of a penicillinase whose synthesis is mediated by an R-factor in Escherichia coli.
Biochem. J. 98, 204

Dixon, M.
1953 Biochem. J. 55, 170, zitiert nach Bisswanger, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik, Verlag Chemie 1979.

Dougherty, Th.J. Koller, A.E. Tomasz, T.	1980	Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 730
Dürckheimer, W. Blumbach, J. Heymes, R. Schrinner, E. Seeger, K.	1981	Chemistry and structure-activity relationships in the aminothiazole cephalosporin series. New beta-lactam antibiotics - A review from chemistry to clinical efficacy of the new cephalosporins. Proceedings of the cephalosporins symposium of the american college of clinical pharmacology. pp. 3
Dürckheimer, W.	1982	Aminothiazol-Cephalosporine, Synthesen und Struktur-Wirkungsbeziehungen. FAC, 1, 17
Dunn, G.L.	1982	Ceftizoxime and other third-generation cephalosporins: structure-activity relationships. J. Antimicrob. Chemother. 10, Suppl. C, 1
Eriquez, L.A. D'Amato, R.F.	1979	Purification by affinity chromatography and properties of a ß-lactamase isolated from Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 229
Findell, C.M. Sherris, J.C.	1976	Susceptibility of Enterobacter to cefamandole: evidence of high mutation rate to resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 9, 970

Fisher, J. Charnas, R.L. Knowles, J.R.	1978	Kinetic studies on the inactivation of Escherichia coli RTEM ß-lactamase by clavulanic acid. Biochem. 17, 2180
Fisher, J. Belasco, J.G. Khosla, S. Knowles, J.R.	1980	ß-Lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the Escherichia RTEM enzyme with cefoxitin. Biochem. 19, 2895
Frieden, C.	1970	Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. J. Biol. Chem. 245, 5788
Fujii-Kuriyama, Y. Yamamoto, M. Sugawara, S.	1977	Purification and properties of beta-lactamase from Proteus morganii. J. Bacteriol. 131, 726
Furth, A.	1979	The ß-lactamases of Pseudomonas aeruginosa. Hamilton-Miller, Smith (eds.): Beta-lactamases, Academic press, pp. 403
Georgopapadakou, N.H. Liu, F.Y.	1980	Penicillin-binding proteins in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 148
Ghuysen, J.-M.	1979	Interaction between ß-lactam antibiotics and the enzymes of the wall peptidoglycan cross-linking system. Hamilton-Miller, Smith (eds.): Beta-lactamases, Academic Press, pp. 181
Ghuysen, J.-M. Frère, J.-M. Leyh-Bouille, M	1979	Use of model enzymes in the determination of the mode of action of penicillins and Δ^3-cephalo-

Coyette, J. Dusart, J. Nguyen-Distèche, M.		sporins. Ann. Rev. Biochem. 48, 73
Ghuysen, J.-M. Charlier, P. Coyette, J. Dideberg, O. Dive, G. Dusart, J. Frère, J.-M. Joris, B. Lamotte-Brasseur, J. Leyh-Bouille, M. Nguyen-Distèche, M	1983	Intrinsic resistance to ß-lactam-antibiotics at the level of the enzyme active site. Many challenges, some achievements. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien SY40/12, pp. 31
Goldner, M. Glass, D.G. Fleming, P.C.	1969	Spontaneous mutant with loss of ß-lactamase in Aerobacter cloacae. J. Bacteriol. 97, 961
Goodwin, C.S. Hill, J.P.	1977	Lysis of Enterobacteria by cefoxitin, cefuroxime, and cephalothin. Antimicrob. Agents Chemother. 11, 26
Gootz, Th.D. Sanders, Ch.C. Goering, R.V.	1982	Resistance to cefamandole: de-repression of ß-lactamases by cefoxitin and mutation in Enterobacter cloacae. J. Inf. Dis. 146, 34
Gray, C.J.	1971	Enzyme-catalysed reactions. Chapter 4, Hydrolysis I, pp. 147. Van Nostrand Reinhold Company, London
Greenwood, D. Eley, A.	1981	Activity of a new cephalosporin antibiotic, Ro 13-9904 against dense populations of selected Enterobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 19, 66

Guymon, L.F. Walstad, D.L. Sparling, P.F. 1978 Cell envelope alterations in antibiotic sensitive and resistant strains of Neisseria gonorrhoeae. J. Bacteriol. 136, 391

Hamilton-Miller, J.M.T. 1963a Penicillinases from Klebsiella aerogenes. Biochem. J. 87, 209

Hamilton-Miller, J.M.T. 1963b Inducible penicillinase in Proteus morganii. Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 43

Hamilton-Miller, J.M.T. 1967 Hydrolysis of cephalosporins by ß-lactamases from gram-negative bacteria. Nature 214, 1333

Hamilton-Miller, J.M.T. Newton, G.G.F. Abraham, E.P. 1970 Products of aminolysis and enzymic hydrolysis of the cephalosporins. Biochem. J. 116, 371

Hamilton-Miller, J.M.T. 1982 ß-Lactamases and their clinical significance. J. Antimicrob. Chemother. 9, Suppl. B, 11

Harder, K.J. Nikaido, H. Matsuhashi, M. 1981 Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin. Antimicrob. Agents Chemother. 20, 549

Hedges, R.W. Jacob, A.E. 1974 Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. Mol. Gen. Genetics 132, 31

Hennessey, T.D. Richmond, M.H. 1968 The purification and some properties of a ß-lactamase

(cephalosporinase) synthesized by Enterobacter cloacae. Biochem. J. 109, 469

Hirai, K. Iyobe, S. Mitsuhashi, S. 1980 Purification and properties of a new ß-lactamase from Pseudomonas cepacia. Antimicrob. Agents Chemother. 17, 355

Hirai, K. Sato, K. Matsubara, N. Katsumata, R. Inoue, M. Mitsuhashi,S. 1981 Immunological properties of beta-lactamases that hydrolyze cefuroxime and cefotaxime. Antimicrob.Agents Chemother. 20, 262

Höfer, M. 1977 Transport durch biologische Membranen. Verlag Chemie, Weinheim

Höltje, J.-V. Said, J.M. 1983 Koordination der Murein-Synthese über Multienzym-Komplexe aus Penicillin-binde-Proteinen. 39. Tagung der DGHM, Bonn

Jack, G.H. Richmond, M.H. 1970 A comparative study of eight distinct ß-lactamases synthesized by gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol. 61, 43

Jaffé, A. Chabbert, Y.A. Semonin, O. 1982 Role of porin proteins ompF and ompC in the permeation of ß-lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 22, 942

Jaffé, A. Chabbert, Y.A. Derlot, E. 1983 Selection and characterization of ß-lactam-resistant Escherichia coli K-12 mutants. Antimicrob. Agents Chemother. 23, 622

Jaurin, B.
Grundström, Th.
1981 ampC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of ß-lactamases of the penicillinase type.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 4897

John, J.F.
Sharbaugh, R.J.
Bannister, E.R.
1982 Enterobacter cloacae: bacteremia, epidemiology and antibiotic resistance.
Reviews of Inf.Dis. 4, 13

Kamimura, T.
Matsumoto, Y.
Okada, N.
Mine, Y.
Nishida, M.
Goto, S.
Kuwahara, S.
1979 Ceftizoxime (FK749), a new parenteral cephalosporin: in vitro and in vivo antibacterial activities.
Antimicrob. Agents Chemother. 16, 540

Kirby, W.M.M.
1944 Extraction of highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci.
Science 99, 452

Kirby, W.M.M.
Ahern,J.J.
1953 Changing pattern of resistance of staphylococci to antibiotics.
Antimicrob. Agents Chemother. 3, 831

Klastersky, J.
1983 Nosocomial infections: current problems and role of the new cephalosporins 1983 update.
Reports on a symposium, Brüssel pp. 35

Knothe, H.
Sietzen, W.
1978 Mikrobiologische Überlegungen zum Einsatz von Antibioitka auf Intensivabteilungen.
Infection 6, Suppl. 2, 191

Knott-Hunziker, V.
Redhead, K.
Petursson, S.
Waley, S.G.
1980 ß-Lactamase action: isolation of an active-site serine peptide from the Pseudomonas enzyme and a penicillin. FEBS Letters 121, 8

Kojo, H.
Nishida, M.
Goto, S.
Kuwahara, S.
1979 Antibacterial activity of Ceftizoxime (FK749), a new cephalosporin, against cephalosporin-resistant bacteria, and its stability to ß-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 16, 549

Komatsu, Y.
Nishikawa, T.
1980 Moxalactam (6059-S), a new 1-oxa-ß-lactam: binding affinity for penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 17, 316

Komatsu, Y.
Murakami, K.
Nishikawa, T.
1981 Penetration of moxalactam into its target proteins in Escherichia coli K-12: comparison of a highly moxalactam-resistant mutant with its parent strain. Antimicrob. Agents Chemother. 20, 613

Lampe, M.F.
Allan, B.J.
Minshew, B.H.
Sherris, J.C.
1982 Mutational enzymatic resistance of Enterobacter species to beta-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 21, 655

Lattrell,R.
Dürckheimer, W.
Klesel, N.
Kirrstetter, R.
Seibert, G.
Wieduwilt, M.
1983 HR810, a new parenteral cephalosporin, I. chemistry and physical properties. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien 99, 1

Laurent, G.
Evrard, G.
Durant, F.
1982 Preliminary results on the X-ray structure analysis of oxyimino cephalosporins.
Eur. J. Med. Chem. 17, 281

Limbert, M.
Seibert, G.
Schrinner, E.
1982 The cooperation of cefotaxime and desacetyl-cefotaxime with respect to antibacterial activity and ß-lactamase stability.
Infection, 10, 55/97

Livermore, D.M.
Williams, J.D.
1981 In-vitro activity of the monobactam, SQ 26776, against gram-negative bacteria and its stability to their ß-lactamases.
J. Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. E, 29

Livermore, D.M.
1983 Kinetics and significance of the activity of the Sabath and Abrahams' ß-lactamase of Pseudomonas aeruginosa against cefotaxime and cefsulodin.
J. Antimicrob. Chemother. 11, 169

Lowry, O.H.
Rosenbrough, N.J.
Farr, A.L.
Randall, R.J.
1951 Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265

Matsubara, N.
Yotsuji, A.
Kumano, K.
Inoue, M.
Mitsuhashi,S.
1981 Purification and some properties of a cephalosporinase from Proteus vulgaris.
Antimicrob. Agents Chemother. 19, 185

Matsuhashi, M.
Ishino, F.
Nakagawa, J.
Mitsui,K.
Nakajima-Iijima, S.
Tamaki, S.
1981 Enzymatic activities of penicillin-binding proteins of Escherichia coli and their sensitivities to ß-lactam antibiotics.
Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press, pp 169

Matsuura, M.
Nakazawa,H.
Inoue, M.
Mitsuhashi, S.
1980 Purification and biochemical properties of ß-lactamase produced by Proteus rettgeri.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 687

Matthew, M.
Harris, A.M.
1976 Identification of ß-lactamases by analytical isoelectric focusing: correlation with bacterial taxonomy.
J. Gen. Microbiol. 94, 55

Matthew, M.
1979 Plasmid-mediated ß-lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution.
J. Antimicrob. Chemother. 5, 349

Medeiros, A.A.
Jacoby, G.A.
1982 Five novel plasmid-determined beta-lactamases found in E. coli and Pseudomonas.
Abstracts of the 1982 ICAAC, p 191

Minami, S.
Yotsuji, A.
Inoue, M.
Mitsuhashi, S.
1980 Induction of ß-lactamase by various ß-lactam-antibiotics in Enterobacter cloacae.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 382

Minami, S.
Inoue, M.
Mitsuhashi, S.
1981 Purification and properties of a cephalosporinase from Enterobacter cloacae.
Antimicrob. Agents Chemother. 18, 853

Mitsuhashi, S.
Inoue, M.
1981 New ß-lactam antibiotics - antibacterial activities and inducibility of ß-lactamase formation.
Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press

Murakami, K.
Yoshida, T.
1981
Role of the 7α-methoxy and side chain carboxyl of moxalactam in ß-lactamase stability and antibacterial activity.
Antimicrob. Agents Chemother. 19, 1

Murakami, K.
Yoshida, T.
1982
Penetration of cephalosporins and corresponding 1-oxa-cephalosporins through the outer layer of gram-negative bacteria and its contribution to antibacterial activity.
Antimicrob. Agents Chemother. 21, 254

Nakano, H.
Kamiya, T.
1981
The development of ceftizoxime, a new parenteral cephalosporin.
Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press pp. 415

Neu, H.C.
Winshell, E.B.
1972
Relation of ß-lactamase activity and cellular location to resistance of Enterobacter to penicillins and cephalosporins.
Antimicrob. Agents Chemother. 1, 107

Neu, H.C.
Meropol. N.J.
Fu, K.P.
1981
Antibacterial activity of ceftriaxone (Ro 13-9904), a ß-lactamase-stable cephalosporin.
Antimicrob. Agents Chemother. 19, 414

Neu, H.C.
1982
Factors that affect the in-vitro activity of cephalosporin antibiotics.
J. Antimicrob. Chemother. 10, Suppl.C, 11

Newton, G.G.F.
Abraham, E.P.
1956 Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic, containing D-α-aminoadipic acid. Biochem. J. 62, 651

Nikaido, H.
Nakae, T.
1979 The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20, 163

Nikaido, H.
1981 Outer membrane permeability of bacteria: resistance and accessibility of targets. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press pp. 249

Nikaido, H.
Rosenberg, E.Y.
Foulds, J.
1983 Porin channels in Escherichia coli: studies with ß-lactams in intact cells. J. Bacteriol. 153, 232

Nikaido, H.
Rosenberg, H.
1983 Porin channel in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. J. Bacteriol. 153, 241

Nikaido, H.
1983 Permeability of the outer membrane of gram-negative bacteria for ß-lactam-antibiotics. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien, 12, 1

Noguchi, H.
Matsuhashi, M.
Nikaido, T.
Itoh, J.
Matsubara, N.
Takaoka, M.
Mitsuhashi, S.
1979 Affinities of ß-lactam antibiotics to bind to penicillin-binding proteins in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in relation to their antibacterial potencies. Mitsuhashi (ed.): Microbial drug resistance. Japan Scientific Societies Press, Tokio, 2, 361

Norrby, S.R. Björnegard, B. Ferber, F. Jones, K.H. 1983 Pharmacokinetics of N-formimidoyl thienamycin in volunteers. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien, 14, 11

Nozaki, Y. Imada, A. Yoneda, M. 1979 SCE-963, a new potent cephalosporin with high affinity for penicillin-binding proteins 1 and 3 of Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 20

O'Callaghan, C.H. Muggleton, P.W. 1963 The formation of metabolites from cephalosporin compounds. Biochem. J. 89, 304

O'Callaghan, C.H. Muggleton, P.W. Ross, G.W. 1968 Effects of ß-lactamase from gram-negative organisms on cephalosporins and penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. (1969),57

O'Callaghan, C.H. 1975 Classification of cephalosporins by their antibacterial activity and pharmacokinetic properties. J. Antimicrob. Chemother. 1, Suppl., 1

O'Callaghan, C.H. 1982 Twenty-five years progress in cephalosporins. FAC 1, 1

Ogawara, H. 1981 Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to ß-lactam antibiotics. Microbiol. Reviews 45, 591

Oka, T. Hashizume, K. Fujita H. 1980 Inhibition of peptidoglycan transpeptidase by ß-lactam antibiotics: structure-activity relationships. J. Antibiot. 33, 1357

Okonogi, K. Kuno, M. Kida, M. Mitsuhashi, S.	1981	ß-Lactamase stability and antibacterial activity of cefmenoxime (SCE-1365), a novel cephalosporin. Antimicrob. Agents Chemother. 20, 171
Olson,B. Weinstein, R.A. Nathan, C. Kabins, S.A.	1983	Broad-spectrum ß-lactam resistance in Enterobacter: emergence during treatment and mechanism of resistance. J. Antimicrob. Chemother. 11, 299
Ott, J.L. Turner, J.R. Mahoney, D.F.	1979	Lack of correlation between ß-lactamase production and susceptibility to cefamandole or cefoxitin among spontaneous mutants of Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 14
Pain, R.H. Virden, R.	1979	The structural and conformational basis of ß-lactamase activity. Hamilton-Miller, Smith (eds.): Beta-lactamases, Academic Press, New York
Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Arbeitsgemeinschaft Resistenz	1982	Resistenz klinischer Isolate einiger Enterobacteriaceae sowie Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus und Streptococcus faecalis gegenüber Chemotherapeutika-Ergebnisse einer überregionalen kooperativen Studie aus den Jahren 1980 und 1981. Infection 10, 310
Pollock, M.R.	1960	in: The Enzymes (Boyer, Lardy, Murbach Eds.) 2nd Edition, vol 4 pp 269, Academic Press, New York

Pollock, M.R. 1965 Purification and properties of penicillinases from two strains of Bacillus licheniformis: a chemical, physico-chemical and physiological comparison. Biochem. J. 94, 666

Ricard, J.
Meunier, J.-C.
Buc, J. 1974 Regulatory behaviour of monomeric enzymes. 1.The mnemonical enzyme concept. Eur. J. Biochem. 49, 195

Richmond, M.H.
Sykes, R.B. 1973 The ß-lactamases of gram-negaive bacteria and their possible physiological role. Adv. Microbiol. Physiol. 9, 31

Richmond, M.H.
Curtis, N.A.C. 1974 The interplay of ß-lactamases and intrinsic factors in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins and cephalosporins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 553

Richmond, M.H.
Clark, D.C.
Wotton, S. 1976 Indirect method for assessing the penetration of beta-lactamase nonsuceptible penicillins and cephalosporins in Escherichia coli strains. Antimicrob. Agents Chemother. 10, 215

Richmond, M.H. 1978 Factors influencing the antibacterial action of ß-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 4, Suppl. B, 1

Richmond, M. 1981 Beta-lactamases and bacterial resistance to beta-lactam antibiotics.

		Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press, N.Y. pp. 261
Ross, G.W. Boulton, M.G.	1973	Purification of ß-lactamases on QAE-Sephadex. Biochim. Biophys. Acta 309, 430
Rübsamen, H. Khandker, R. Witzel, H.	1974	Sigmoid kinetics of the monomeric ribonuclease I due to ligand-induced shifts of conformation equilibria. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 687
Sabath, L.D. Jago, M. Abraham, E.P.	1965	Cephalosporinase and penicillinase activities of a ß-lactamase from Pseudomonas **pyocyanea** Biochem. J. 96, 739
Saikawa, I. Matsubara, N. Minami, S.	1981	Studies on new beta-lactam antibiotics having 2,3-dioxopiperazine group: piperacillin and cefoperazon. Salton, Shockman (eds.): ß-lactam-antibiotics, Academic Press,N.Y., pp. 353
Salton, M.R.J.	1981	ß-lactam antibiotics - mode of action, new developments, and future prospects. Introduction. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press, N.Y.
Sanders, Ch.C. Sanders Jr., W.E.	1979	Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 15, 792

Sanders, Ch.C.
Sanders Jr, W.E.
Goering, R.V.
1982 In vitro antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. Antimicrob. Agents Chemother. 21, 968

Sanders, Ch.C.
1983 Novel resistance selected by the new expanded-spectrum cephalosporins: a concern. J. Inf. Dis. 147, 585

Sawai, T.
1968 zitiert nach: Sykes und Smith in: Beta-Lactamases, Hamilton-Miller, Smith (eds.) Academic Press, N.Y. 1979

Sawai, T.
Hiruma, R.
Kawana, N.
Kaneko, M.
Taniysu, F.
Inami, A.
1982 Outer membrane permeation of ß-lactam antibiotics in Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Enterobacter cloacae. Antimicrob. Agents Chemother. 22, 585

Sawai, T.
Tsukamoto, K.
1982 Cefoxitin, N-formimidoyl thienamycin, clavulanic acid, and penicillanic acid sulfone as suicide inhibitors for different types of ß-lactamases produced by gram-negative bacteria. J. Antibiot. 35, 1594

Schindler,H.
Rosenbusch, J.P.
1978 Matrix protein from Escherichia coli outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3751

Schindler, P.
Huber, G.
1980 Use of PADAC, a novel chromogenic ß-lactamase substrate, for the detection of ß-lactamase producing organisms and assay of ß-lactamase

inhibitors/inactivators.
Brodbeck: Enzyme inhibitors, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 169

Seeberg, A.H. Tolxdorff-Neutzling, R.M. Wiedemann, B. 1983 Chromosomal ß-lactamases of Enterobacter cloacae are responsible for resistance to third-generation cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 23, 918

Seeberg, A.H. 1983 Epidemiologie und genetische Grundlagen der Resistenz gegen moderne Cephalosporine. Doktorarbeit an der Math.-Nat.-Fakultät der Rhein.-Fried.-Wilh.-Universität, Bonn

Seeberg, A.H. Wiedemann, B. 1984 Transfer of the chromosomal bla-gene from Enterobacter cloacae to Escherichia coli by RP4:: Mini-Mu. J. Bacteriol. 157, 89

Seibert, G. Limbert. M. 1982 Purification and characterization of a cephalosporinase from E. coli. Zbl. Bakt. Hyg. 253, 358

Shigi, Y. Kojo, H. Wakasugi, M. Nishida, M. 1981 Differences between Ceftizoxime and its stereoisomer in antibacterial activity and affinity for penicillin-binding proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 19, 393

Simpson, I.N. James, M. 1982 Comparison of routine techniques for cell breakage and release of ß-lactamase activity. J. Antimicrob. Chemother. 9, 119

Smith, J.T.	1963	Sulphydryl-group essential for the penicillinase activity of Aerobacter cloacae. Nature 197, 900
Spratt, B.G.	1975	Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2999
Spratt, B.G.	1977a	Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K 12. Eur. J. Biochem. 72, 341
Spratt, B.G.	1977b	The mechanism of action of mecillinam. J. Antimicrob. Chemother. 3, Suppl. B, 13
Spratt, B.G. Jobanputra, V. Schwarz, U.	1977a	Mutants of Escherichia coli which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. FEBS Letters, 79, 374
Spratt, B.G. Jobanputra, V. Zimmermann, W.	1977b	Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 12, 406
Stanier, R.Y. Adelberg, E.A. Ingraham, J.L.	1979	General Microbiology. 4th edition, The Macmillian Press Ltd., London
Stapley, E.O. Birnbaum, J.	1981	Chemistry and microbiological properties of the cephamycins. Salton, Shockman (eds.): ß-lactam-antibiotics, Academic Press, N.Y. pp. 327

Stickland, L.H.	1951	The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. J. Gen. Microb. 5, 698
Stryer, L.	1979	Biochemie. Vieweg, Braunschweig
Sykes, R.B. Matthew, M.	1976	The ß-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to ß-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2, 115
Sykes, R.B. Matthew., M	1979	Detection, assay, and immunology of ß-lactamase. Hamilton-Miller, Smith (eds.): Beta-lactamases, Academic Press, New York
Sykes, R.B. Nordström, K.	1972	zitiert nach Sykes und Matthew, 1979
Sykes, R.B. Cimarusti, C.M. Bonner, D.P. Bush, K. Floyd, D.M. Georgopapadakou, N.H. Koster, W.H. Liu, W.C. Parker, W.L. Principe, P.A. Rathnum, M.L. Slusarchyk, W.A. Trejo, W.H. Wells, J.S.	1981	Monocyclic ß-lactam antibiotics produced by bacteria. Nature 291, 489
Sykes, R.B. Bonner, D.P. Bush, K. Georgopapadakou, N.H. Wells, J.S.	1981	Monobactams - monocyclic ß-lactam antibiotics produced by bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. E, 1

Sykes, R.B. 1982 The classification and terminology of enzymes that hydrolyze ß-lactam antibiotics. J. Inf. Dis. 145, 762

Tajima, M., Takenouchi, Y., Sugawara, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S. 1980 Purification and properties of chromosomally mediated ß-lactamase from Citrobacter freundii GN 7391. J. Gen. Microbiol. 121, 449

Tajima, M., Masuyoshi, S., Inoue, M., Takenouchi, Y., Sugawara, S., Mitsuhashi, S. 1981 Purification and properties of ß-lactamases from Serratia marcescens. J. Gen. Microbiol. 126, 179

Then, R.L., Anghern, P. 1982 Trapping of nonhydrolyzable cephalosporins by cephalosporinases in Enterobacter cloacae and Pseudomonas aeruginosa as a possible resistance mechanism. Antimicrob. Agents Chemother. 21, 711

Toda, M., Sato, K., Nakazawa, H., Inoue, M., Mitsuhashi, S. 1980 Effects of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) on ß-lactamases and activity against ß-lactamase-producing strains. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 837

Tolxdorff-Neutzling, R.M., Wiedemann, B. 1983 HR810, a cephalosporin with low affinity for Enterobacter cloacae beta-lactamase. Eur. J. Clin. Microbiol. 2, 352

Van Alphen, W., Van Boxtel, R., Van Selm, N., Lugtenberg, B. 1978 Pores in the outer membrane of Escherichia coli K 12. Involvement of proteins b and c in the permeation of cephaloridine and

ampicillin.
FEMS Microbiol. Letters 3, 103

van der Weghe, M.
Martin, H.H.
1983
Beta-Laktamasen und Penicillinbindung als Ressitenzfaktoren in einem hochresistenten Enterobacter cloacae-Stamm.
Ullmann (Hrsg.): Betalaktamasen, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart S. 65

Warburg, O
Christian, W.
1941
Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem. Z. 310, 384

Waxman, D.J.
Strominger, J.L.
1983
Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of ß-lactam antibiotics.
Ann. Rev. Biochem. 52, 825

Weaver, S.S.
Bodey, G.P.
LeBlanc, B.M.
1979
Thienamycin: new beta-lactam antibiotic with potent broad-spectrum activity.
Antimicrob. Agents Chemother. 15, 518

Weber, K.
Pringle, J.R.
Osborn, M.
1972
Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels.
Colwick, Caplan (eds.): Methods in enzymology, vol 26, Academic Press, N.Y., pp.3

Wiedemann, B.
1981
Development of bacterial resistance to antibiotics.
Elsevier North-Holland Biomedical Press: New trends in antibiotics: Research and Therapy.
Grassi, Sabath (eds.), pp. 179

Wiedemann, B.
Tolxdorff-Neutzling,R.M.
1983
Die Betalactamase-Stabilität von Cefmenoxim.
FAC 2, 239

Wiedemann, B. Tolxdorff-Neutzling,R.M.	1984	The influence of beta-lactamases on minimal inhibitory concentrations. Infection 11, Suppl. 2, 71
Wilkinson, P.J.	1978	Das Mikrotitersystem für die Empfindlichkeitsprüfung. Imm. Inf. 6, 267
Williamson, R. Zighelboim, S. Tomasz, A.	1981	Penicillin-binding proteins of penicillin-resistant and penicillin-tolerant Streptococcus pneumoniae. Salton, Shockman (eds.): ß-Lactam-antibiotics, Academic Press, N.Y., pp. 215
Wise, R. Andrews, J.M. Hancox, J.	1981	SQ 26776, a novel ß-lactam: an in-vitro comparison with other antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. E, 39
Wise, R. Brown, R.M. Andrews, J.M.	1983	A comparison of the pharmacokinetics and tissue penetration of four cephalosporins. 13th International Congress of Chemotherapy, Wien, 100, 7
Yamamoto, T. Murayama, S.Y. Sawai, T.	1983	Cloning and expression of the gene(s) for cephalosporinase production of Citrobacter freundii. Mol. Gen. Genet. 190, 85
Yokota, T. Azuma, E.	1980	Biochemical aspects of bacterial resistance to new ß-lactam drugs non-hydrolyzable by ß-lactamases. Mitsuhashi, Rosival, Krcmery (eds.): Antibiotic resistance, Springer Verlag,Berlin, pp 333

Yoshida, T.
Matsuura, S.
Mayama, M.
Kameda, Y.
Kuwahara, S.
1980 Moxalactam (6059-S), a novel 1-oxa-ß-lactam with an expanded antibacterial spectrum: laboratory evaluation. Antimicrob. Agents Chemother. 17, 302

Yoshida, T.
1981 Structure-activity relationships leading to the development of 1-oxacephem, 6059-S (Moxalactam). Salton, Shockman (eds.): ß-lactam-antibiotics, Academic Press, N.Y., pp. 403

Yoshimura, F.
Nikaido, H.
1982 Permeability of Pseudomonas aeruginosa outer membrane to hydrophilic solutes. J. Bacteriol. 152, 636

Yourassowsky, E.
Van der Linden, M.P.
Lismont, M.J.
Crokaert, F.
1981a Growth curve patterns of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa submitted to differnt SQ 26776 concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. E, 89

Yourassowsky, E.
Van der Linden, M.P.
Lismont, M.L.
Crokaert, F.
1981b Growth curves of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa submitted to different ceftazidime concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 8, Suppl. B, 127

Yotsuji, A.
Minami, S.
Inoue, M.
Mitsuhashi, S.
1982 Inducer activity of ß-lactam antibiotics for the ß-lactamases of Proteus rettgeri and Proteus vulgaris. J. Antibiot. 35, 1590

Zimmermann, W.
Rosselet, A.
1977 Function of the outer membrane of Escherichia coli as a permeability barrier to beta-lactam antibiotics.
Antimicrob. Agents Chemother.
12, 368

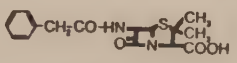
Zimmermann, W.
1979 Penetration through the gram-negative cell-wall: a co-determinant of the efficacy of beta lactam antibiotics.
Int. J. Clin. Pharm. Biopharm.
17, 131

7. Anhang

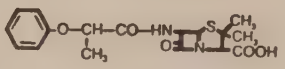
Strukturformeln von Penicillinen und Cephalosporinen

Penicilline

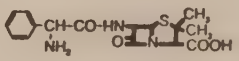
Penicillin G (1941)



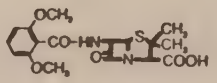
Pheneticillin (1960)



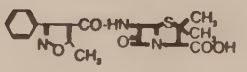
Ampicillin (1961)



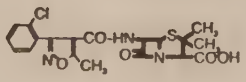
Methicillin (1961)



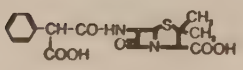
Oxacillin (1962)



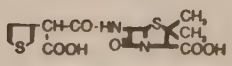
Cloxacillin (1965)



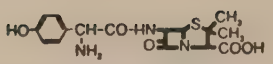
Carbenicillin (1967)



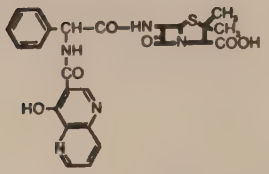
Ticarcillin (1973)



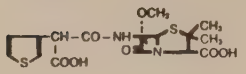
Amoxicillin (1973)



Apalcillin (1975)

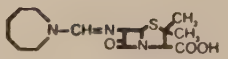


Temocillin (1981)



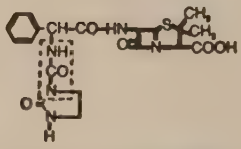
Amidinopenicillin

Mecillinam (1967)

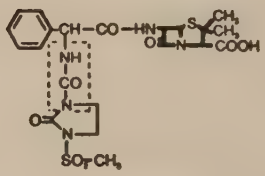


Acylureidopenicilline

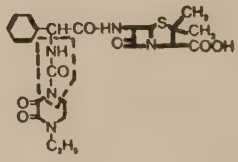
Azlocillin (1974)



Mezlocillin (1974)

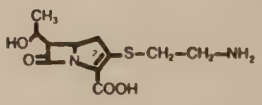


Piperacillin (1975)

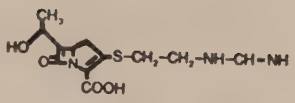


Carbapeneme

Thienamycin (1976)

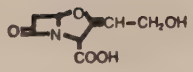


Imipenem (1977)
(N,F-Thienamycin)



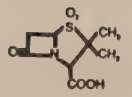
Clavam

Clavulansäure (1975)



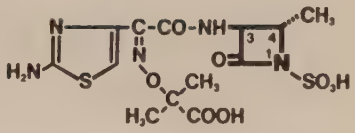
Penam

Sulbactam (1977)



Monobactam

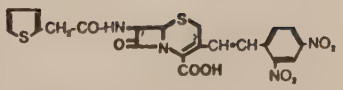
Azthreonam (1981)



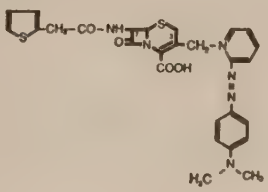
Cephalosporine

Chromogene Cephalosporine

Nitrocefin

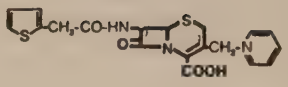


PADAC (1981)

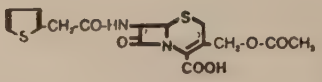


Cephalosporine der ersten Generation

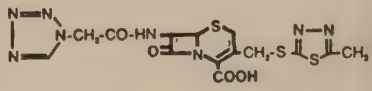
Cephaloridin (1962)



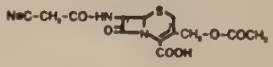
Cephalothin (1964)



Cefazolin (1971)

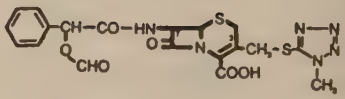


Cephacetril (1972)

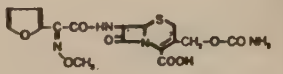


Cephalosporine der zweiten Generation

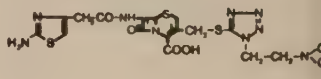
Cefamandol-Nafat (1973)



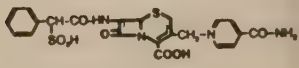
Cefuroxim (1974)



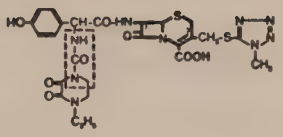
Cefotiam (1977)



Cefsulodin (1977)

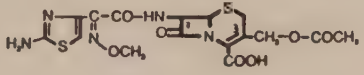


Cefoperazon (1978)

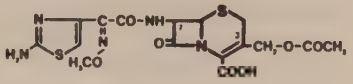


Cephalosporine der dritten Generation und neueste Aminothiazol-Cephalosporine

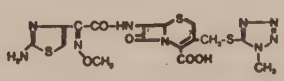
Cefotaxim (syn) (1977)



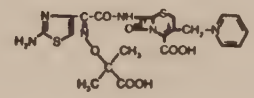
Ru 25328 (anti) (1983)



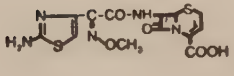
Cefmenoxim (1978)



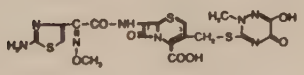
Ceftazidim (1978)



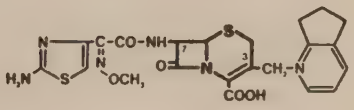
Ceftizoxim (1979)



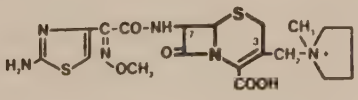
Ceftriaxon (1980)



HR 810 (1983)

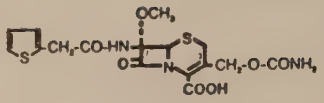


BMY 28142 (1983)

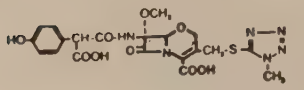


Cephamycine

Cefoxitin (1970)

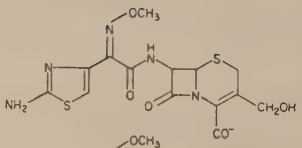


Latamoxef (1978)

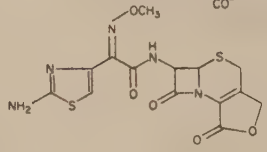


Stoffwechselprodukte von Cefotaxim

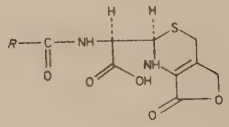
Desacetylcefotaxim



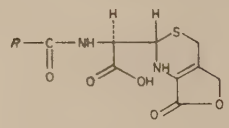
Desacetylcefotaxim-Lacton



UP1



UP2



Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann danke ich für die Überlassung des Themas und seine Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. H.G. Trüper, Direktor des Instituts für Mikrobiologie der Universität Bonn, danke ich für die Möglichkeit wichtige biochemische Methoden in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Dr. R. Werner, Fa. Thomae, Biberach a.d. Riß, danke ich für einen dreiwöchigen Aufenthalt in seiner Abteilung und die vielen wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. H.P. Kroll und Herrn Dr. I. Haller, Fa. Bayer, Wuppertal, danke ich für Hilfe und Anregung bei der Enzymreinigung.

Herrn Dr. G. Seibert, Fa. Hoechst, Frankfurt a. Main, danke ich für die freundliche Übersendung von Literatur.

Frl. E. Kessel möchte ich für die Bestimmung der Hydrolyseraten von TEM-1 und die Erstellung der MHK-Werte mit HR810 und BMY21842 danken.

Den Mitarbeitern der Abteilung danke ich für Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich, daß sie mir durch finanzielle Unterstützung im ersten Jahr diese Dissertation ermöglicht haben.

Dem Cusanuswerk, Bonn, sei für die großzügige Gewährung eines Stipendiums gedankt.

Mein ganz besonderer Dank aber, gilt meinem Mann Dipl. biol. Otmar Neutzling für Durchführung von Gelfiltrationen, Molekulargewichtsbestimmung und "peptide mapping". Darüberhinaus war er ein wichtiger und geduldiger Diskussionspartner, der mich immer wieder ermutigte und stets mit wertvollen Ratschlägen zur Verfügung stand.

Lebenslauf

Am 6.5.1956 wurde ich, Regina Tolxdorff-Neutzling, als erstes von vier Kindern der Eheleute Dipl. agr. Felix Tolxdorff und Marlis, geb. Haus in Duisburg geboren. 1958 zogen meine Eltern nach Bonn und im Frühjahr 1963 wurde ich dort in die St.-Elisabeth-Grundschule eingeschult. Im Dezember 1963 zogen wir nach Ingelheim/Rh und ich besuchte die Grundschule "In der Dörrwies", Ingelheim/Rh. bis Dezember 1966. Von Dezember 1966 bis Juni 1975 besuchte ich das Staatl.-Sebastian-Münster-Gymnasium, Ingelheim/Rh. (neusprachlicher Zweig) und bestand das Abitur am 5.6.1975. Im Oktober 1975 wurde ich zum Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Bonn zugelassen und absolvierte die Diplom-Vorprüfung am 25.11.1977. Am 3.8.1979 heiratete ich den Biologiestudenten Otmar Neutzling. Den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung legte ich im Mai 1980 ab und fertigte anschließend im Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn eine experimentelle Diplomarbeit mit dem Titel " Studien zur Regulation der Alanindehydrogenase aus Wildtyp und einer pleiotropen Nut^--Mutante (C1) von Rhodopseudomonas capsulata AD2" unter Anleitung von Prof. J.-H. Klemme an. Das Diplom der Biologie erhielt ich am 14.8.1981. Im Okt. 81 begann ich bei Prof. B. Wiedemann am Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, Abteilung Med. Mikrobiologie für Pharmazeuten mit der vorliegenden Dissertation. Von Oktober 1982 bis Dezember 1984 erhielt ich ein Stipendium des Cusanuswerks, Bonn.